Aspetos hematológicos do envelhecimento: anemia fisiológica, patológica, ou ambas?

Ana Rita Nunes Andrade

Monografia do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas

Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva e do Professor Doutor Elísio Costa

Setembro, 2012

Declaração de reprodução

É autorizada a reprodução integral desta monografia apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Agradecimentos

A presente monografia, realizada no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, representa o desfecho de mais uma etapa da minha vida, realizada com muito empenho e que jamais seria passível de concretizar sem a presença, apoio, carinho e colaboração de diversas pessoas.

À Professora Doutora Alice Santos Silva, pela disponibilidade, paciência e sugestões adequadas essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Elísio Costa pelas correções e críticas construtivas extremamente úteis para a elaboração deste trabalho.

A todos os docentes do Mestrado em Análises Clínicas pelos conhecimentos transmitidos, fundamentais para a minha formação no âmbito das Análises Clínicas.

Aos meus pais, por todo o apoio, sacrifício e compreensão em todos os momentos da minha vida académica e pessoal.

A todos os meus amigos/as e familiares pelas palavras de conforto nos momentos menos fáceis deste trajeto.

A todos os que referi e àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e ajudaram a concretizar esta etapa da minha vida.

Muito Obrigada

Resumo

A anemia, definida pelos critérios da Organização Mundial de Saúde (concentração de hemoglobina <12 g/dL nas mulheres e <13 g/dL nos homens) é uma patologia hematológica bastante frequente na população idosa e que tem sido subdividida em quatro tipos, anemia por carências nutricionais, anemia da inflamação crónica, anemia por doença renal crónica e anemia de causa inexplicada.

A redução da disponibilidade de oxigénio no rim desencadeia a produção de eritropoietina. Com o envelhecimento a capacidade que o rim tem para segregar eritropoietina, em resposta à hipóxia, diminui, paralelamente com o decréscimo da função renal.

A anemia tem diversas consequências adversas nos idosos, tais como alterações na qualidade de vida, comprometimento cognitivo e da capacidade funcional, aumento do risco de quedas e fraturas, de morbilidade e mortalidade. Assim, o diagnóstico e o tratamento adequados de cada tipo de anemia permitem minimizar estas consequências adversas e melhorar a qualidade de vida dos doentes.

A idade cronológica pode ser diferente da idade biológica. Existem variáveis [envelhecimento capilar, elasticidade da pele e função arterial (envelhecimento vascular)] que estão relacionadas com a idade cronológica, enquanto outras (capacidade pulmonar, audição, função cognitiva e visual) não se associam necessariamente com a idade cronológica.

Ainda que envelhecer e adoecer não sejam sinónimos, com o aumento da idade ocorrem alterações anatómicas e fisiológicas que tornam os idosos mais vulneráveis ao aparecimento de diversas patologias.

Com o envelhecimento ocorrem alterações vasculares (aumento da espessura da túnica íntima-média, calcificações da parede vascular, bem como a rigidez, levando à perda de *compliance* da aorta e artérias principais), renais e hematopoiéticas (redução da linha linfoide e a aumento da linha mieloide, o que promove um ambiente pró-inflamatório).

A patogénese do envelhecimento renal não está bem esclarecida devido à dificuldade em compreender quanto das alterações renais são devidas ao processo de envelhecimento natural e quanto está relacionado com os efeitos cumulativos de toxinas e doenças. A presença frequente de comorbilidades nos idosos pode ter um efeito aditivo nas alterações da estrutura e função renal, o que pode confundir e amplificar o efeito da idade, por si só, sobre a estrutura e funcionalidade renal. É provável que a exposição cumulativa a fatores de riscos cardiovasculares e renais em indivíduos com predisposição genética resulte no que parece ser um declínio da função renal relacionado com a idade.

A doença renal crónica é um problema de saúde comum na população idosa, é definida utilizando a taxa de filtração glomerular e classificada em cinco estadios. Com a alteração

da função renal, associada à idade, os níveis de eritropoietina sofrem alterações podendo levar a anemia.

O comprometimento da função renal nos idosos parece resultar da combinação de alterações fisiológicas e patológicas.

O estado pró-inflamatório ligeiro encontrado nos idosos pode levar a mudanças no metabolismo do ferro bem como no processo eritropoiético que podem contribuir para o desenvolvimento de anemia.

As alterações vasculares, renais e na medula hematopoiética e o estado pró-inflamatório ligeiro e crónico, decorrentes do processo de envelhecimento, em associação com as comorbilidades, que frequentemente afetam os idosos, favorecem o desenvolvimento de anemia nesta população.

Palavras-chave: Anemia; Idoso; Rim; Hematopoiese; Inflamação.

Abstract

Anemia, defined by World Health Organization's criteria (hemoglobin concentration <12 g/dL in women and <13 g/dL in men) is an hematologic disease quite common in the elderly and has been subdivided into four types, anemia by nutritional deficiencies, anemia of chronic inflammation, anemia of chronic kidney disease and unexplained anemia.

The reduction of oxygen available to the kidney triggers the production of erythropoietin. With aging, the kidney has less ability to secrete erythropoietin in response to hypoxia in parallel with decreasing renal function.

Anemia has many adverse consequences in the elderly, such as changes in life's quality, cognitive impairment and functional capacity, increased risk of falls and fractures, morbidity and mortality. Thus, the appropriate diagnosis and treatment of each type of anemia allows to minimize these adverse consequences and improves the quality of life in these patients.

Chronological age may be different from biological age. There are variables [graying of hair, skin elasticity and arterial function (vascular aging)] that are related to chronological age, while others (lung capacity, hearing, visual and cognitive function) is not necessarily associated with chronological age.

Aging and illness are not synonymous, but with aging, anatomical and physiological changes occur and make elderly most vulnerable to an onset of various diseases.

With aging, vascular changes occur (increased intima and media thickness, vascular wall calcification, as well as the stiffness, leading to a loss of aorta and major arteries' compliance), renal and hematopoietic (reduction of the linfoide line and increase of the myeloid line, which promotes a proinflammatory environment).

The pathogenesis of renal aging is not well clarified. There is a certain difficulty in understanding how much the renal changes are due to the natural aging process and how much is related to the cumulative effects of toxins and diseases. The frequent presence of comorbidities in the elderly can have an additive effect on the functional and renal structures' modifications. This can amplify the aging effects on the kidney's structure and function. Probably, the cumulative exposure to cardiovascular and renal risk factors in individuals with also genetic predisposition may result in what appears to be a decline in renal function correlated with aging.

The chronic kidney disease is a common health problem in the elderly population, is defined using the glomerular filtration rate and classified into five stages. With the shift of renal function associated with aging, the erythropoietin levels experience some changes that lead to anemia.

Physiological and pathological conditions may be implicated in the impairment of renal function in the elderly population.

The light proinflammatory state found in the elderly can lead to changes in iron metabolism and in erythropoietic processes that may contribute to the development of anemia.

The vascular, renal and hematopoietic marrow deviations and the light chronic proinflammatory state, that outcome from the aging process, in combination with comorbidities, that often affect elderly, favor the development of anemia in this population.

Keywords: Anemia; Elderly; Kidney; Haematopoiesis; Inflamation.

Índice

Agradecimentos i
Resumo ii
Abstract iv
Índice de Figuras viii
Índice de Tabelas viii
Lista de abreviaturas ix
1. Definição de anemia no idoso 1
2. Epidemiologia da anemia na população idosa 2
3. Etiologia da anemia no idoso 4
3.1. Anemia por deficiência em nutrientes eritropoiéticos 4
3.2. Anemia da inflamação crónica 5
3.2.1. Patogénese da anemia da inflamação crónica 6
3.3. Anemia da doença renal crónica 10
3.4. Anemia de causa inexplicada 12
4. Resposta fisiológica à anemia no idoso 14
5. Complicações associadas à anemia no idoso 16
5.1. Complicações cardiovasculares 16
5.2. Alterações motoras 17
5.3. Alterações na função cognitiva e neurológica 18
6. Diagnóstico e tratamento da anemia no idoso 19
7. Patologias associadas ao envelhecimento 26
7.1. Doenças cardiovasculares 26
7.2. Diabetes *Mellitus* 26
7.3. Hipertensão arterial sistémica 26
7.4. Glomerulopatias 27
7.5. Infeção do trato urinário 27
7.6. Alterações na função endócrina 27
7.6.1. Insuficiência androgénica 27
7.6.2. Decréscimo da hormona do crescimento 28
8. Alterações vasculares e renais associadas ao envelhecimento 29
8.1. Alterações vasculares 29
8.2. Alterações renais 30
9. Alterações hematopoiéticas no idoso 40
9.1. "Envelhecimento" das células estaminais hematopoiéticas e alterações da sua expressão génica 40
9.2. Alteração nos níveis de eritropoietina 42

9.3. Associação com estados pró-inflamatórios....43
9.4. Outras....44
10. Insuficiência renal crónica no idoso: fisiológica, patológica ou ambas? 45
Conclusão....47
Bibliografia 49

Índice de Figuras

Figura 1- Percentagem de indivíduos anémicos, tendo em conta o sexo e a idade. NHANES III, fase 1 e 2. 1988 a 1994.....2
Figura 2 - Papel da hepcidina na regulação do metabolismo do ferro. 8
Figura 3 - Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à AIC.....11
Figura 4 - Regulação do HIF1-α em condições de normóxia e de hipóxia 15
Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo hemodinâmico para compensar a anemia..... 17
Figura 6 - Representação esquemática do diagnóstico de anemia microcítica no idoso 20
Figura 7 - Representação esquemática do diagnóstico de anemia normocítica no idoso ...22
Figura 8 - Representação esquemática do diagnóstico de anemia macrocítica no idoso ...23
Figura 9 - Representação esquemática da patogénese proposta para o envelhecimento renal e lesão renal associada.....32
Figura 10 - Fatores e marcadores de risco para a iniciação e progressão da DRC.....34

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Percentagem de indivíduos anémicos com idade superior a 65 anos por raça/etnia e sexo. NHANES III, fase 1 e 2, 1988 a 1994.....3
Tabela 2 - Distribuição das anemias por deficiência nutricional (deficiência em ferro, folato e vitamina B12) em indivíduos com idade superior a 65 anos, dos Estados Unidos da América: NHANES III, fase 2, 1991 a 1994 5
Tabela 3 - Distribuição da AIC, anemia por DRC e AI em idosos dos Estados Unidos da América, com idade superior a 65 anos. NHANES III, fase 2, 1991 a 1994 6
Tabela 4 - *Guidelines* para a utilização dos agentes estimuladores da eritropoiese em indivíduos com anemia.....25
Tabela 5 - Classificação da DRC em cinco estadios, de acordo com a TFG e complicações associadas a cada um dos estadios 33
Tabela 6 - Semelhanças e diferenças a nível renal entre os idosos, com mais de 85 anos de idade, e os doentes com DRC em estadio 3 39

Lista de abreviaturas

ADC - Anemia da doença crónica

ADMA - Dimetilarginina assimétrica (*Asymmetric dimethylarginine*)

AI - Anemia de causa inexplicada

AIC - Anemia da inflamação crónica

ANP - Péptido natriurético tipo-A (*A-type natriuretric peptide*)

ApoA-IV - Apolipoproteína A-IV (*Apolipoprotein A-IV*)

CHF - Insuficiência cardíaca congestiva (*Congestive heart failure*)

CHGM - Concentração da hemoglobina globular média

CKD-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*

DCV - Doença cardiovascular

DMT1 - Proteína transportadora divalente de metal 1 (*Protein divalent metal transporter* 1)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRC - Doença renal crónica

EAM - Enfarte agudo do miocárdio

EMA - *European Medicines Agency*

EPESE - *Establised Population for Epidemiologic Studies of the Elderly*

Epo - Eritropoietina

EpoR - Recetores da eritropoietina

ESRD - Estadio final da doença renal (*End-stage renal disease*)

FDA - *Food and Drug Administration*

FGF23 - Fator de crescimento de fibroblastos 23 (*Fibroblast growth factor* 23)

HAMP - *Hepcidin antimicrobial peptide*

Hb - Hemoglobina

Hct - Hematócrito

HFE - Proteína da hemocromatose humana (*Human hemochromatosis protein*)

HGM - Hemoglobina globular média

HIF - Fator induzido pela hipóxia (*Hypoxia-inducible factor*)

HRE - *Elemento de resposta à hipóxia* (*Hypoxia response element*)

HSC - Célula estaminal hematopoiética (*Hematopoietic stem cell*)

IL -Interleucina

KIM-1 - *Kidney injury molecule* 1

LEAP-1 - Péptido antimicrobiano expresso pelo fígado (*Liver-expressed antimicrobial peptide*)

L-FABP - Proteína ligadora de ácidos gordos no fígado (*Liver-type fatty acid binding protein*)

LMA - Leucemia mieloide aguda
LPS - Lipopolissacarídeos
LVH - Hipertrofia ventricular esquerda (*Left ventricular hypertrophy*)
MDRD - *Modification of Diet Renal Disease*
MIF - Fator inibidor da migração dos macrófagos (*Macrophage migration inhibitory factor*)
MMA - Ácido metilmalónico (*Methylmalonic acid)*
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
NFkB - Fator nuclear Kappa B (*Nuclear Factor kappa B*)
NGAL - *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*
NHANES III - *Third National Health and Nutrition Examination survey*
NT-proBNP - *N-terminal pro-brain natriuretic peptide*
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAD - Pressão arterial diastólica
PAS - Pressão arterial sistólica
PCR - Proteína c reativa
PTH - Hormona da paratiroide (*Parathyroid hormone*)
pVHL - Proteína *von Hippel-Lindau*
RDW - Coeficiente de variação eritrocitária (*Red cell distribution width*)
rhEpo - Eritropoietina recombinante humana (*Recombinant human erythropoietin*)
ROS - Espécies reativas de oxigénio (*Reactive oxygen species*)
SelE - Seletina com expressão no endotélio vascular
SelL - Seletina com expressão nos leucócitos
SelP - Seletina com expressão nas plaquetas
SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida
SMD - Síndrome mielodisplásico
TFG - Taxa de filtração glomerular
TIBC - Capacidade total de fixação de ferro (*Total iron binding capacity*)
TNF-α - Fator de necrose tumural – alfa (*Tumor necrosis factor α*)
UTR - *Untranslated region*
VGM - Volume globular médio
VIH - Vírus da imunodeficiência humana

1. Definição de anemia no idoso

A anemia é considerada um problema de saúde pública a nível mundial, sendo a alteração hematológica mais frequente na população idosa. [1-3]

A anemia é definida como uma redução na concentração de hemoglobina (Hb), desencadeada por diversos mecanismos fisiopatológicos. [4] Embora exista algum debate sobre quais os valores de Hb que devem ser utilizados para a definição de anemia na população idosa, [5] segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) a anemia é definida por uma concentração de Hb <12 g/dL nas mulheres e Hb <13 g/dL nos homens. [4, 6] Segundo, Culleton *et al* [7], o valor ideal de Hb em adultos idosos é de aproximadamente 13,0 a 15,0 g/dL na mulher e de 14,0 a 17,0 g/dL no homem. Segundo este estudo, e o *Cardiovascular Health Study,* [8] os valores de Hb para o diagnóstico de anemia nos idosos devem ser redefinidos.

Ao contrário da anemia dos adultos jovens, a anemia em idosos não é muitas vezes diagnosticada, nem atribuível a uma única causa, podendo estar associada a uma variedade de causas, incluindo insuficiência renal, inflamação, deficiência de testosterona, diminuição de células estaminais proliferativas e deficiências nutricionais. [9]

A anemia nos idosos é, frequentemente, uma condição sub-diagnosticada, nem sempre informada ao doente, pelo facto de ser entendida como uma mera consequência do processo de envelhecimento ou como um marcador de doença crónica. No entanto, estudos recentes têm questionado esta visão, defendendo que a presença de anemia nos idosos reflete um estado de saúde comprometido e um aumento da vulnerabilidade para consequências adversas. [10-12]

2. Epidemiologia da anemia na população idosa

O *Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III 1991-1994) [13] é um estudo representativo de civis adultos não-institucionalizados dos Estados Unidos da América, especificamente planeado para recolher informações sobre a prevalência da anemia nos principais subgrupos demográficos, incluindo a população idosa. Este estudo demonstrou que 10,6% dos adultos com mais de 65 anos apresentavam anemia, com uma prevalência de 11,0% e de 10,2% em homens e mulheres, respetivamente. A grande maioria dos casos de anemia era ligeira, com menos de 1% dos idosos com uma concentração de Hb <10 g/dL e menos de 3% com concentração de Hb <11 g/dL. Neste estudo a incidência da anemia nos adultos com idade superior a 85 anos duplicou, apresentando valores superiores a 20%. (Figura 1)

A prevalência de anemia nos homens é mais baixa entre as idades de 17 e 49 anos, enquanto para as mulheres, é entre os 50 e os 64 anos. A prevalência de anemia aumenta em função da idade, tanto nos homens como nas mulheres, mas esse aumento é mais evidente nos homens. Nas idades superiores a 75 anos, a anemia é mais comum nos homens do que nas mulheres. [13]

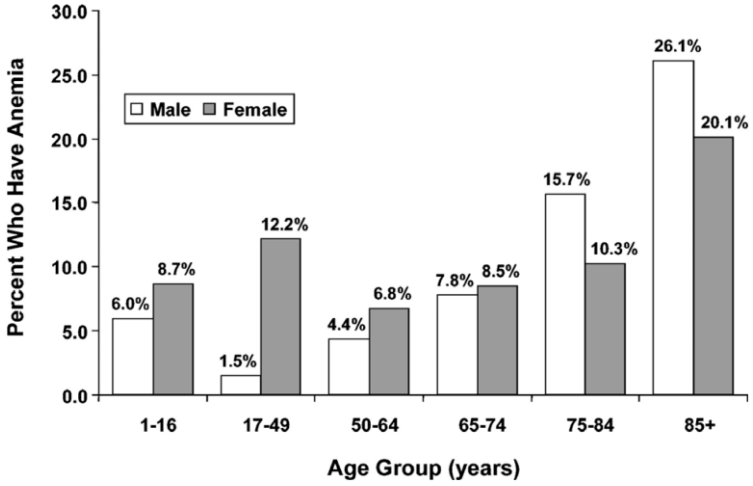


Figura 1- Percentagem de indivíduos anémicos, tendo em conta o sexo e a idade. NHANES III, fase 1 e 2. 1988 a 1994. [13]

Estes valores de prevalência de anemia no idoso são semelhantes aos referidos no *Leiden 85-plus Study* [14], no *Cardiovascular Health Study* [8] e no *Established Population for Epidemiologic Studies of the Elderly* (EPESE). [15, 16] Estes estudos mostraram, ainda, que a anemia afeta negros não-hispânicos numa taxa quase três vezes superior à dos brancos não-hispânicos. [8, 13, 15] (Tabela 1)

Tabela 1 - Percentagem de indivíduos anémicos com idade superior a 65 anos por raça/etnia e sexo.[2] NHANES III, fase 1 e 2, 1988 a 1994. [adaptado de Guralnik J *et al*, 2004] [13]

Raça/Etnia	**Homem %**	**Mulher %**	**Total %**
Brancos não-hispânicos	9,2	8,7	9,0
Negros não-hispânicos	27,5	28,0	27,8
Américo-Mexicanos	11,5	9,3	10,4
Outros	20,4	7,5	14,0
Total	11,0	10,2	10,6

A população negra apresenta uma prevalência maior de anemia do que a caucasiana e nas faixas etárias mais avançadas (acima de 65 anos) chega a ser três vezes maior (27% versus 9%). Tal deve-se ao facto de a definição de anemia ser a mesma para todas as raças; no entanto, provavelmente por razões biológicas, os níveis de Hb nos indivíduos de raça negra são mais baixos e, portanto, a definição de anemia deveria ter este aspeto em consideração. [5, 13]

O estudo NHANES III [13] mostrou que a prevalência de anemia varia de acordo com o sexo, raça e idade.

O estudo de Skjelbakken *et al* [17] estimou que nas idades entre 75-84 anos a prevalência de anemia, definida pelos critérios da OMS, foi de 15,0% nos homens e 7,1% nas mulheres. Em indivíduos com idade superior a 85 anos, a anemia esteve presente em 29,6% dos homens e em 16,5% das mulheres.

Estas estimativas de prevalência de anemia indicam que este problema hematológico atinge aproximadamente 1 em cada 4 homens e 1 em cada 5 mulheres com idade superior a 85 anos, residentes na comunidade. [13]

O facto de os homens serem mais propensos para a anemia do que as mulheres, em idades mais avançadas, evidencia a importância do sexo como critério específico para a definição de anemia no idoso. [18]

3. Etiologia da anemia no idoso

O elevado número de comorbilidades e a poli-medicação frequentes nos idosos, dificultam a determinação da causa subjacente à anemia nesta população. No NHANES III [13], aproximadamente dois terços dos participantes com anemia tiveram duas ou mais patologias associada com a idade.

Embora a anemia seja geralmente multifatorial, as principais causas têm sido divididas em três grandes grupos: [5, 13, 19]

- Anemia por deficiência em nutrientes (vitamina B12, folato e ferro);
- Anemia das doenças crónicas (ADC), ou anemia da inflamação crónica (AIC);
- Anemia de causa inexplicada (AI).

Há quem considere ainda um outro tipo de anemia no idoso, a anemia por doença renal crónica (DRC). [5]

Das anemias de causa conhecida, as que mais frequentemente afetam os idosos são a AIC e a anemia por deficiência em ferro; no entanto, mesmo após uma avaliação cuidadosa, o mecanismo subjacente à anemia permanece inexplicado numa grande quantidade de casos – AI. [3, 13, 20]

O NHANES III estudou a prevalência e etiologia da anemia num grande número de idosos que viviam na comunidade. A maioria dos casos de anemia era ligeira, com apenas 2,8% das mulheres e 1,6% dos homens com um nível de Hb inferior a 11 g/dL. Aproximadamente um terço das pessoas com anemia tinham deficiência nutricional, um terço AIC, DRC, ou ambas, e um terço tinha AI. [13]

3.1. Anemia por deficiência em nutrientes eritropoiéticos

Aproximadamente um terço dos casos de anemia em adultos mais velhos são atribuídos às deficiências em ferro, folato e/ou de vitamina B12. A deficiência em ferro, por si só, é responsável por quase metade dos casos das anemias causadas por deficiências nutricionais. [13]

Enquanto alguns casos de deficiência em ferro resultam de uma dieta inadequada, a maior parte dos casos deriva de perda sanguínea gastrointestinal crónica, por esofagites, gastrites, úlceras, cancro do cólon ou pólipos pré-malignos, ou angiodisplasia. Alterações no trato gastrointestinal são identificadas na maior parte dos doentes com anemia por deficiência em ferro. [19] Por exemplo, em 100 doentes com anemia por deficiência em ferro, a endoscopia gastrointestinal mostrou que 62% tinham uma lesão que poderia associar perda de sangue e 16% tinham pólipos pré-malignos ou cancro do cólon. O diagnóstico de deficiência em ferro em adultos mais velhos é difícil, porque a concentração de ferritina sérica, indicadora do valor de armazenamento de ferro, aumenta com a idade e com as patologias associadas com a idade. [5]

As deficiências em folato e vitamina B12 também são comuns entre idosos residentes na comunidade, sendo responsáveis por cerca de 14% do total dos casos de anemia. No NHANES III, [13] a identificação de deficiência em vitamina B12 foi baseada na determinação da sua concentração sérica, que poderá não detetar os casos subclínicos de deficiência em vitamina B12. [21] Se o doseamento do ácido metilmalónico (MMA) tivesse sido incluído no protocolo analítico, este valor em conjunto com o doseamento da homocisteína teria, possivelmente, permitido a identificação de mais casos de deficiência em vitamina B12 ligeira e, portanto, a prevalência da anemia relacionada com deficiência em vitamina B12 seria superior. [5]

A tabela 2 mostra a distribuição das anemias por deficiência nutricional em idosos com idade superior a 65 anos.

Tabela 2 - Distribuição das anemias por deficiência nutricional (deficiência em ferro, folato e vitamina B12) em indivíduos com idade superior a 65 anos, dos Estados Unidos da América: NHANES III, fase 2, 1991 a 1994. [adaptado de Guralnik J *et al*, 2004] [13]

Anemia	**Nº nos USA**	**Tipo, %**	**Total anemia, %**
Com deficiência em nutrientes			
Apenas ferro	467000	48,3	16,6
Apenas folato	181000	18,8	6,4
Apenas vitamina B12	166000	17,2	5,9
Folato e vitamina B12	56000	5,8	2,0
Ferro com folato ou vitamina B12 ou ambos	95000	9,9	3,4
Total	965000	100,0	34,3

3.2. Anemia da inflamação crónica

A AIC é observada em associação com infeções, doenças reumatológicas, patologias malignas e outras patologias crónicas. Em termos bioquímicos, é classicamente caracterizada por diminuição dos níveis séricos de ferro e da capacidade total de fixação de ferro (TIBC), com ferritina sérica elevada. [22]

Não é surpreendente que quase um terço dos casos de anemia (19,7%) em idosos seja classificado como AIC, dado que os idosos apresentam frequentemente múltiplas comorbilidades. [13] É também comum que a AIC ocorra concomitantemente com outras causas de anemia, incluindo deficiência em ferro, o que poderá dificultar a confirmação do diagnóstico etiológico da anemia. [23, 24] A distribuição da AIC, AI, e anemia por DRC, segundo o estudo NHANES III é apresentada na tabela 3. [13]

Tabela 3 – Distribuição da AIC, anemia por DRC e AI em idosos dos Estados Unidos da América, com idade superior a 65 anos. NHANES III, fase 2, 1991 a 1994. [adaptado de Guralnik J *et al*, 2004] [13]

Anemia	Nº nos USA	Tipo, %	Total anemia, %
Sem deficiência em nutrientes			
Apenas doença renal	230000	12,4	8,2
AIC, sem doença renal	554000	30,0	19,7
Doença renal e AIC	120000	6,5	4,3
AI	945000	51,1	33,6
Total	1849000	100,0	65,7

A prevalência de AIC, por si só, foi provavelmente sobrestimada no estudo NHANES III, dado que a anemia por deficiência em ferro pode ser falseada pelo facto dos níveis séricos de ferritina poderem apresentar-se normais quando ambos os tipos de anemia estão presentes. Na verdade, mesmo a distinção entre a AIC e anemia por DRC não é fácil, dada a evidência de aumento do processo inflamatório associado à disfunção renal. [25]

Considerando a enorme extensão de morbilidades clínicas e subclínicas entre os idosos, bem como o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias que acompanham o envelhecimento, a identificação da patologia subjacente à AIC em idosos é muitas vezes bastante difícil. [5]

3.2.1. Patogénese da anemia da inflamação crónica

Embora a etiologia da AIC tenha sido atribuída a uma redução no tempo de vida dos eritrócitos, a alterações na disponibilidade em ferro para a eritropoiese, a resistência progressiva dos progenitores eritroides à ação da eritropoietina (Epo), a um aumento da apoptose dos precursores eritroides a nível da medula óssea e à produção inadequada de Epo, o papel relativo de cada um destes mecanismos permanece ainda por esclarecer. Estes mecanismos parecem ser mediados pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). [19] Estas citocinas pró-inflamatórias e as células do sistema reticuloendotelial induzem alterações no tempo de vida dos eritrócitos, na homeostasia do ferro, na produção de Epo e na proliferação de células progenitoras eritroides, o que contribui para a patogénese da AIC. [24]

A eritropoiese pode ser afetada por uma doença subjacente à AIC através da infiltração de células tumorais na medula óssea ou de microrganismos, ou por outras patologias como o síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), hepatite C e malária. Além disso, as células tumorais podem produzir citocinas pró-inflamatórias e radicais livres que danificam as células progenitoras eritroides. Episódios de hemorragia, deficiências de

vitaminas (por exemplo, de vitamina B12 e ácido fólico), hiperesplenismo, hemólise autoimune, disfunção renal e intervenções rádio e quimioterapêuticas também podem agravar a anemia. [24]

A nível do metabolismo do ferro a AIC é caracterizada pelo desenvolvimento de perturbações da sua homeostasia, com redução da absorção e aumento da retenção de ferro no interior das células do sistema reticuloendotelial, diminuindo a disponibilidade em ferro para as células progenitoras eritroides, limitando a eritropoiese. [24]

Em 2001 Park *et al* [26] isolaram um novo péptido em urina humana que denominaram de hepcidina, por ser sintetizado no fígado (*liver*, hep-) e pelas suas propriedades antimicrobianas *in vitro* (-cidin). Um ano antes, Krause *et al* [27] tinham isolado o mesmo péptido em plasma ultrafiltrado e designaram-no por *liver-expressed antimicrobial peptide* (LEAP-1). Este pequeno polipéptido hepático, que atualmente também pode ser designado por *hepcidin antimicrobial peptide* (HAMP), apresenta 25 aminoácidos, é o principal regulador da homeostasia do ferro e tem vindo a ser implicado na patogénese da AIC. [28, 29] Estímulos inflamatórios ativam os monócitos e os linfócitos T para produzirem citocinas pró-inflamatórias. Estas, particularmente a IL-6, induzem a produção e a libertação de hepcidina pelos hepatócitos. A hepcidina liga-se à proteína membranar ferroportina, um canal de efluxo de ferro na superfície dos enterócitos, dos macrófagos e dos hepatócitos, induzindo a sua internalização e degradação nos lisossomas, bloqueando assim a exportação de ferro a partir destas células. Consequentemente diminui a absorção intestinal de ferro, os macrófagos libertam menos ferro (bloqueio da libertação de ferro pelos macrófagos) e os hepatócitos retêm as reservas de ferro, o que leva a uma queda dos níveis séricos do mesmo, com restrição de ferro para a eritropoiese, que condiciona a anemia. [30] A síntese de hepcidina é regulada pelos níveis de ferro sérico, anemia, hipóxia tecidular e pelo grau de inflamação. Quando a disponibilidade de oxigénio é inadequada, a resposta homeostática é aumentar a produção de eritrócitos. Em caso de anemia, os níveis de hepcidina diminuem havendo, por isso, mais ferro disponível para a eritropoiese. O promotor de hepcidina contém muitos locais de ligação para o HIF (fator induzido pela hipóxia) sendo, provavelmente, este o mecanismo de regulação hipóxica da hepcidina. Uma dieta rica em ferro ou a transfusão sanguínea aumentam a síntese de hepcidina; no entanto, os mecanismos reguladores associados a este aumento de hepcidina são ainda pouco conhecidos. (Figura 2) [31]

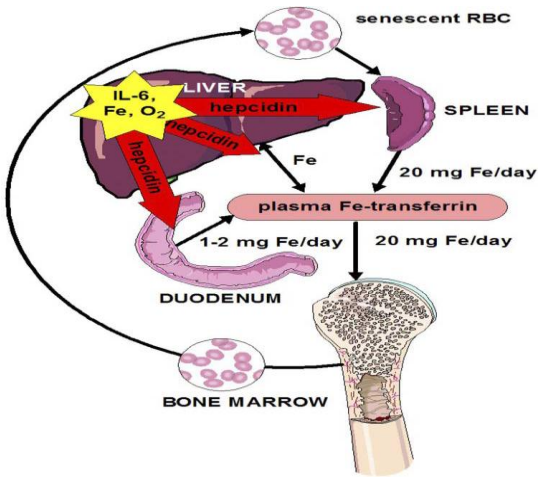


Figura 2 - Papel da hepcidina na regulação do metabolismo do ferro.
A hepcidina regula negativamente a absorção intestinal de ferro, a reciclagem de ferro pelos macrófagos, a libertação de ferro pelos hepatócitos e, durante a gravidez, a transferência de ferro pela placenta. A secreção de hepcidina é regulada pelas reservas de ferro, oxigenação e pelos marcadores inflamatórios (como a IL-6). [31]

Alguns estudos mostraram que ratos transgénicos que sobrexpressavam hepcidina e que ratos aos quais se administrou hepcidina sintética desenvolviam anemia hipocrómica e microcítica ligeira a moderada. [32, 33]

Os níveis de hepcidina estão reduzidos em caso de eritropoiese deficitária em ferro; pelo contrário, na presença de citocinas pró-inflamatórias a expressão do gene de hepcidina é sobreregulada. [34]

A diminuição de hepcidina em doentes com hemocromatose hereditária tem sido atribuída a mutações no gene da *HFE* (*Human hemochromatosis protein*), do recetor de transferrina, na hemojuvelina, e no próprio gene da hepcidina. A hepcidina está também diminuída em doentes com síndromes talassémicos e anemia diseritropoiética congénita do tipo I. [35, 36]

Doentes com AIC apresentam habitualmente um aumento na ferritina, e diminuição do ferro sérico e da TIBC, associado com o aumento dos níveis de hepcidina. Doentes em terapêutica transfusional apresentam também um aumento nos níveis séricos de hepcidina. [22]

Ferrucci *et al* [37], numa recente análise de um subgrupo de doentes do estudo *Invecchiare in Chianti, aging in the Chianti area* (InCHIANTI) avaliaram a associação entre os níveis de hepcidina urinária, marcadores pró-inflamatórios, "status" de ferro e o grau de anemia. Neste estudo foram avaliados idosos com diferentes formas de anemia e em controlos não anémicos. Os autores tinham como expectativa encontrar níveis urinários de hepcidina aumentados nos participantes com AIC e nos que apresentavam concentração sérica elevada de marcadores pró-inflamatórios. Também tinham a expectativa de que os participantes com anemia por deficiência em ferro teriam diminuição nos níveis de hepcidina urinária, como uma tentativa de maximizar a absorção de ferro e a sua biodisponibilidade. No entanto, os resultados indicaram que os elevados

níveis de marcadores inflamatórios, como a IL-6 e a proteína c reativa (PCR), estavam associados com a anemia e com a diminuição do "status" de ferro (o ferro sérico diminuiu significativamente com o aumento dos marcadores inflamatórios) mas, contrariamente ao que era expectável, não foi encontrada correlação entre os níveis de hepcidina urinária e os marcadores inflamatórios, levando os autores do estudo a postular que a sobreprodução da hepcidina pode ocorrer apenas em situações em que o aumento do processo inflamatório é evidente.

Este estudo sugere que o estado pró-inflamatório ligeiro encontrado nos idosos não está associado com altos níveis de hepcidina urinária. Este estado pró-inflamatório ligeiro foi associado com baixa concentração de ferro sérico, que, todavia, não parece dever-se ao efeito mediador da hepcidina. Estes resultados reforçaram a possibilidade de que outros mecanismos podem causar hipoferrinemia (ex. regulação direta da ferroportina pelos marcadores inflamatórios) e AIC, e/ou que mesmo níveis normais de hepcidina são suficientes para o desenvolvimento da anemia quando ela está já iniciada. [37]

Outros estudos têm demonstrado que a expressão do gene da hepcidina é induzida pela IL-6 e lipopolissacarídeos (LPS), mas não pela IL-1α ou pelo TNF-α. [38] O aumento da IL-6 tem vindo também a ser associado a um decréscimo do ferro sérico e da saturação de transferrina. [35]

O tratamento de hepatócitos *in vitro* com IL-6 e LPS aumenta a expressão do gene da hepcidina, sendo inibida por anticorpos anti-IL-6. [39]

As doenças nas quais a hepcidina está inapropriadamente aumentada, devido a mutações em genes supressores [40] ou à sua produção autónoma por adenomas hepáticos, [29] são caracterizadas por anemia com diminuição da disponibilidade em ferro e com resistência à suplementação com o mesmo. O aumento dos níveis de hepcidina tem sido também detetado em doenças caracterizadas por inflamação evidente, tais como a artrite reumatoide, abcessos e sépsis. [41]

Um estudo recente [42] avaliou a relação entre os níveis de Epo, Hb, e moléculas inflamatórias (PCR, IL-6, IL-1, IL-1β, TNF-α) em idosos. Em média, os níveis de Epo aumentaram linearmente com a diminuição da Hb para valores abaixo de 13 g/dL e foram estáveis para valores de Hb superiores a 13 g/dL. Nos pacientes sem anemia observou-se um aumento significativo na Epo com aumento dos marcadores inflamatórios, enquanto que nos participantes com anemia houve um decréscimo da Epo com aumento dos marcadores inflamatórios, ou seja, nos doentes com anemia os altos níveis de marcadores inflamatórios associavam-se com baixas concentrações de Epo relativamente ao nível de Hb. A relação entre os marcadores inflamatórios e a Epo varia em função do estado de anemia, sugerindo que a AIC evolui de um estado pré-anémico, caracterizado por um aumento compensatório de Epo que mantém os níveis de Hb normais, para um estado

clínico de anemia evidente, no qual os níveis de Epo não são suficientes para manter o nível normal de Hb, possivelmente devido aos efeitos inibitórios da inflamação na produção de Epo. Esta hipótese requer, no entanto, mais estudos.

Na inflamação crónica, a aquisição de ferro pelos macrófagos ocorre predominantemente através de eritrofagocitose e pela importação transmembranar de ferro ferroso pela *protein divalent metal transporter* 1 (DMT1). O interferon-γ, LPS, e TNF-α aumentam a expressão de DMT1, aumentando a absorção de ferro em macrófagos ativados. Estes estímulos pró-inflamatórios induzem também a retenção de ferro em macrófagos, por diminuição da expressão de ferroportina, bloqueando a libertação de ferro a partir destas células.

Tem sido proposto que as citocinas pró-inflamatórias têm a capacidade de inibir a eritropoiese através do aumento da apoptose dos progenitores eritroides. A Epo tem sido considerada um fator antiapoptótico crítico na eritropoiese, quando em concentração adequada. Contudo, na presença de um aumento de citocinas pró-inflamatórias, a produção de Epo pode ser inadequada e a eritropoiese comprometida. Sob condições normais, existe uma relação inversa entre a concentração de Hb e os níveis séricos de Epo, na população idosa. A AIC é considerada um estado clínico com deficiência relativa de Epo podendo ser tratada recorrendo ao uso de agentes estimuladores da eritropoiese. [19]

Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à AIC encontram-se ilustrados na figura 3.

3.3. Anemia da doença renal crónica

O rim é a maior fonte de Epo e, embora não seja diretamente linear, sabe-se que a produção de Epo é menos adequada em doentes com DRC e, portanto, esta é uma causa comum de anemia. [9]

No NHANES III [13], cerca de 8% dos participantes com anemia apresentavam anemia da DRC, e aproximadamente 4% dos doentes com anemia apresentavam insuficiência renal e AIC. No entanto, poucos estudos têm avaliado a relação entre a função renal e a anemia associada com o envelhecimento. Estes estudos indicam que há um limiar de função renal abaixo do qual o risco de anemia aumenta, mas o valor desse limiar varia de estudo para estudo, de 30 mL/min a 60 mL/min. [43, 44] Este problema é agravado pela utilização de diferentes equações para estimar a taxa de filtração glomerular (TFG), bem como de diferentes ensaios para avaliação da creatinina sérica. [5]

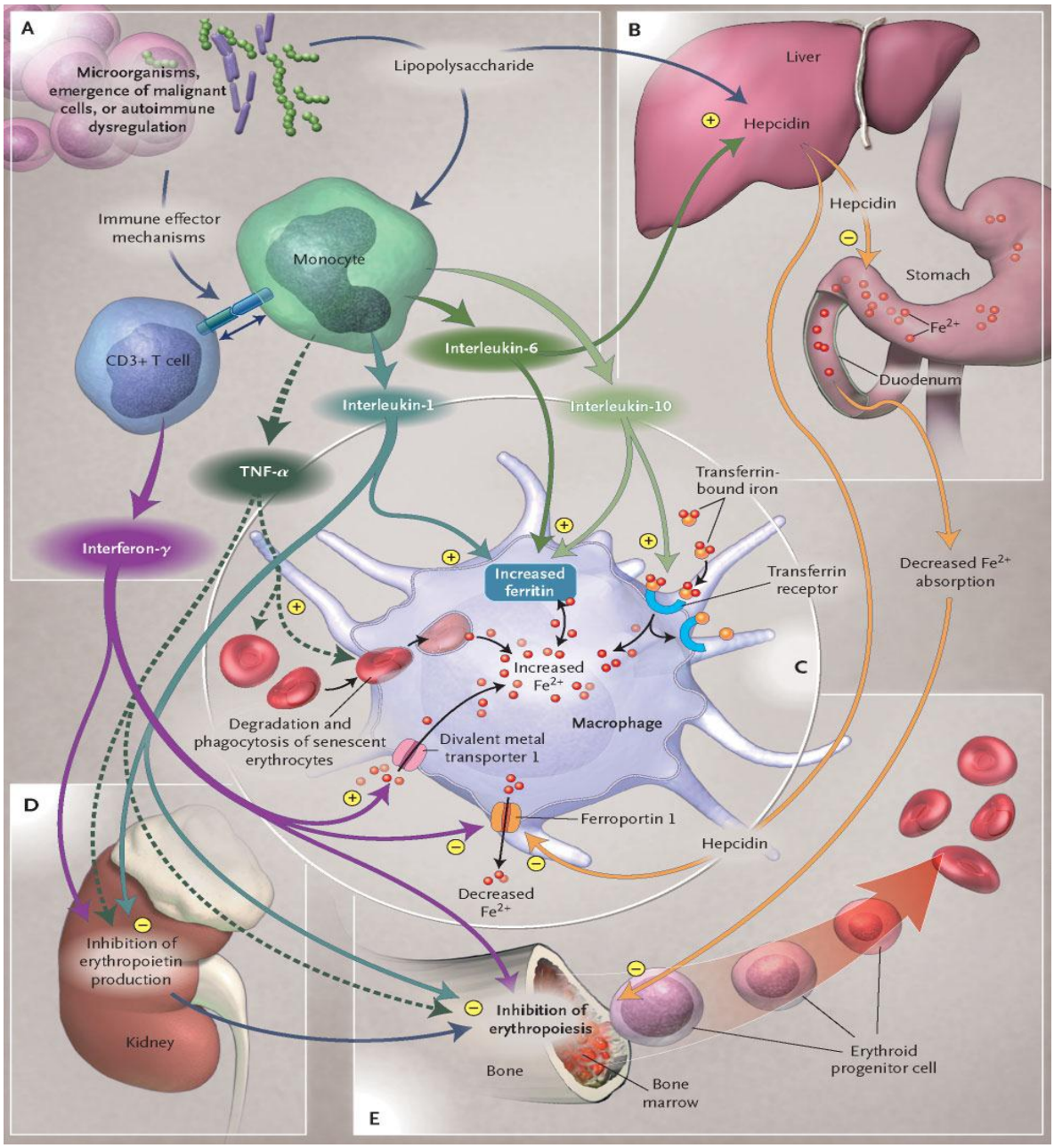


Figura 3 - Mecanismos fisiopatológicos subjacentes à AIC.
A - a invasão de microrganismos, o aparecimento de células malignas, ou a desregulação autoimune leva à ativação de células T ($CD3^+$) e monócitos. Estas células induzem mecanismos efetores imunitários, produzindo, assim, as citocinas, tais como interferon-γ (a partir de linfócitos T), e TNF-α, IL-1, IL-6, e IL-10 (a partir de monócitos ou macrófagos). **B** - a IL-6 e LPS estimulam a expressão hepática da proteína de fase aguda hepcidina, a qual inibe a absorção duodenal de ferro. **C** - o interferon-γ, LPS, ou ambos aumentam a expressão do DMT1 em macrófagos e estimulam a absorção de ferro ferroso (Fe^{2+}). A citocina anti-inflamatória IL-10 aumenta a expressão do recetor de transferrina e aumenta, mediada pelo recetor de transferrina, a ligação de ferro à transferrina em monócitos. Além disso, os macrófagos ativados fagocitam e degradam eritrócitos senescentes para a reciclagem de ferro, um processo que é ainda mais induzido pelo TNF-α através da danificação das membranas de eritrócitos e estimulação da fagocitose. O interferon-γ e LPS diminuem a expressão do transportador de ferro de macrófagos ferroportina 1, inibindo assim a exportação de ferro a partir de macrófagos, um processo que é também afetado pela hepcidina. Ao mesmo tempo, o TNF-α, IL-1, IL-6, e IL-10 induzem a expressão de ferritina e estimulam o armazenamento e retenção de ferro no interior dos macrófagos. Em resumo, estes mecanismos levam a um decréscimo da concentração de ferro em circulação e assim a uma disponibilidade limitada em ferro para as células eritroides. **D** - o TNF-α e o interferon-γ, inibem a produção de Epo pelo rim. **E** - TNF-α, interferon-γ, e IL-1 inibem diretamente a diferenciação e proliferação de células progenitoras eritroides. Além disso, a disponibilidade limitada em ferro e o decréscimo da atividade biológica da Epo levam à inibição da eritropoiese e ao desenvolvimento de anemia. (24)

3.4. Anemia de causa inexplicada

No estudo NHANES III [13], um terço dos idosos com anemia não apresentava critérios que permitiam classificar a anemia como associada a défices nutricionais, AIC, ou anemia da DRC sendo, portanto, classificados como tendo AI. Provavelmente alguns destes casos de AI estavam associados a síndromes mielodisplásicos (SMD), uma outra situação hematológica comum nos idosos. [5] Neste estudo, 17,2% dos casos de AI podia ser atribuída a SMD, pela coocorrência de neutropenia, de trombocitopenia, ou de macrocitose e de AI. No entanto, uma proporção substancial dos casos de anemia (aproximadamente 25%) permanecia inexplicada, mesmo depois da identificação dos casos de SMD. [13]

O SMD é um síndrome de falência medular comum em idosos, em que a anemia é uma das manifestações iniciais, podendo evoluir para pancitopenia e sofrer posteriormente transformação celular para leucemia mieloide aguda (LMA). [45] No SMD [46] nenhuma lesão recorrente no DNA foi identificada, o que sugere em alternativa que alterações epigenéticas ou mudanças no microambiente da medula óssea possam estar na origem desta transformação. A biópsia da medula óssea é essencial para avaliar alterações displásicas em múltiplas linhagens de células hematopoiéticas e proceder a um diagnóstico definitivo de SMD. [47]

A fisiopatologia da AI em doentes idosos permanece por esclarecer e o diagnóstico é feito habitualmente por exclusão. Embora a anemia seja de causa inexplicada, muitos processos biológicos conhecidos, que ocorrem com a idade, podem contribuir, individualmente ou em combinação, para esta anemia. [9, 48]

Várias explicações têm sido propostas para o aumento da AI associado com o aumento da idade:

- Alterações em progenitores eritroides, células estaminais hematopoiéticas (HSC), e no microambiente da medula óssea; [49]
- Redução da reserva de HSC totipotentes; [50, 51]
- Redução da produção de fatores de crescimento hematopoiéticos; [50, 51]
- Redução da sensibilidade das HSC e dos progenitores aos fatores de crescimento; [50, 51]
- Estimulação eritropoiética insuficiente em resposta à anemia; [52, 53]
- Diminuição da produção de Epo; [54, 55]
- Desregulação da produção de citocinas, que afetam a produção ou a resposta à Epo ou alteram a disponibilidade em ferro; [35, 42]
- DRC não reconhecida; [50, 51]
- Mielodisplasia não diagnosticada; [50, 51]

- Estado anterior de AIC; [50, 51]
- Redução dos níveis de androgénios. [56, 57]

Segundo Vanasse *et al* [22] a sobrexpressão de citocinas pró-inflamatórias é um determinante importante da AI em idosos, induzindo anemia pela supressão da formação das colónias eritroides [*macrophage migration inhibitory factor* (MIF)/TNF-α/IL-1β] e por comprometerem a utilização de ferro (IL-6/hepcidina).

É possível que o aumento de citocinas pró-inflamatórias, relacionado com o envelhecimento, como o aumento da IL-6, possa reduzir a resposta das HSC e dos progenitores hematopoiéticos a fatores de crescimento, incluindo a Epo. [51] Os níveis plasmáticos de IL-6 estão habitualmente elevados em caso de infeção, trauma ou *stress*, e a regulação desta citocina torna-se menos precisa com o envelhecimento. [58] Um estudo feito a partir de uma população constituída por 220 mulheres (entre os 25 e os 104 anos de idade) aparentemente saudáveis mostrou um aumento exponencial da IL-6 com a idade. O mecanismo subjacente a este aumento nos níveis de IL-6 nos idosos é ainda pouco claro, mas parece estar relacionado com o aumento da sua produção pelos monócitos, linfócitos T, células endoteliais e/ou células ósseas. [59]

4. Resposta fisiológica à anemia no idoso

A diminuição da disponibilidade de oxigénio a nível renal desencadeia a produção de Epo (o principal regulador da eritropoiese) pelas células que revestem os capilares peritubulares renais. O fornecimento inadequado de oxigénio aos rins pode ocorrer em diferentes situações, tais como anemia, hipoperfusão devido a arteriosclerose renal, diminuição do fluxo sanguíneo renal, insuficiência cardíaca, ou diminuição da saturação de oxigénio devido a patologias como a doença pulmonar obstrutiva crónica. [30] A diminuição da função renal, relacionada com a idade, pode levar a uma resposta atenuada de produção de Epo e a anemia. [43]

Tem sido sugerido que a capacidade do rim para segregar Epo em resposta à hipoxia tecidular diminui com o envelhecimento. [60] No entanto, atualmente há resultados controversos no que diz respeito à resposta à Epo na anemia do idoso em comparação com a população mais jovem, e poucos dados estão disponíveis sobre a relação entre a função renal e o risco de anemia em pessoas idosas que sejam representativas da população em geral. [61]

O gene *Epo* é um dos muitos genes regulados pela hipóxia e a sua expressão é controlada pelo fator de transcrição HIF. Os fatores HIF-1 e HIF-2 (cada um composto por dímeros de subunidades α e β) são fatores de transcrição que controlam a regulação transcricional de vários genes envolvidos em diversos processos, incluindo a proliferação e sobrevivência celular eritroide, metabolismo glicolítico, angiogénese e metabolismo do ferro. [62] (Figura 4)

Apenas as subunidades α do HIF são reguladas pela hipóxia e a sua expressão é controlada pós-transcricionalmente. Sob condições de normóxia o HIF-1α é rapidamente degradado pela via da ubiquitina no proteossoma, que requer a proteína *von Hippel-Lindau* (pVHL), ferro, O_2 e a prolina hidroxilase; este complexo constitui o sensor da quantidade de oxigénio. Em normóxia, os resíduos de prolil do HIF-1α são hidroxilados pela enzima prolil hidroxilase, que permite que a pVHL se ligue ao HIF-1α. A pVHL faz parte de um complexo multiproteico que atua como uma ligase de ubiquitina. Após a ligação do pVHL ao HIF-1α, uma cauda de poliubiquitina é adicionada ao HIF-1α que é rapidamente degradado no proteossoma. [62] Sob condições de hipóxia o HIF-1α não é hidroxilado, em vez disso entra rapidamente no núcleo e liga-se ao HIF-1β. O complexo heterodimérico de HIF-1α e HIF-1β liga-se ao *hypoxia response element (*HRE), localizado na região *enhancer* 3` do gene *Epo* e atua em sinergismo com o promotor para iniciar a transcrição *de novo* da Epo. [48]

O HIF-1α e HIF-2α exibem alta sequência homóloga, mas têm padrões de expressão de mRNA diferentes: o HIF-1α é expresso ubiquamente, enquanto a expressão do HIF-2α é restrita a certos tecidos. [62]

O rim é o principal local de produção de Epo e o HIF-1 é o principal regulador da transcrição do gene *Epo* nos rins. Noutros tecidos, tais como cérebro e fígado (que gera 20% de Epo circulante), a transcrição do gene *Epo* depende do HIF-2. A recente descrição de um elemento de resposta ao ferro na região 5'-UTR do HIF-2α revela uma ligação reguladora entre a disponibilidade em ferro e a expressão de HIF-2α, que também pode influenciar o controlo da eritropoiese. Quando a quantidade de ferro é limitada, o HIF-2α diminui, e quando o ferro é abundante, o HIF-2α hepático aumenta, estimulando a produção hepática de Epo e, portanto, promovendo a eritropoiese. A importância do HIF-2α na regulação do gene *Epo* foi recentemente demonstrada por uma mutação com ganho de função no HIF-2α causando eritrocitose. [62]

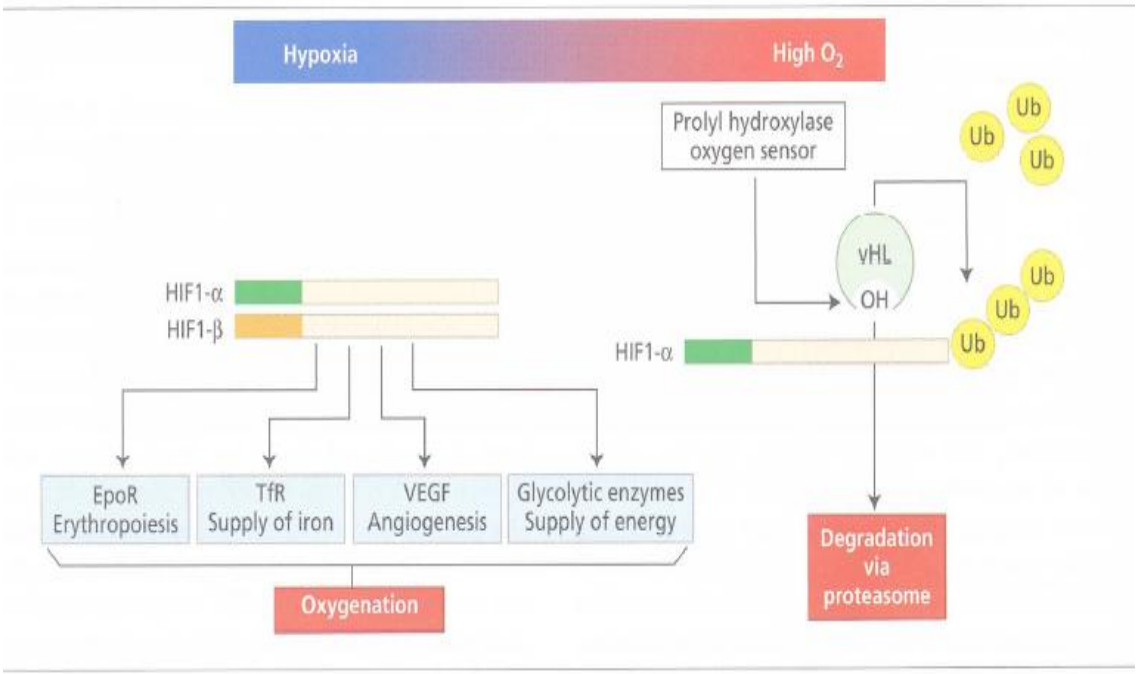


Figura 4 – Regulação do HIF1-α em condições de normóxia e de hipóxia. [63]

5. Complicações associadas à anemia no idoso

A anemia tem diversas consequências adversas nos idosos, tais como alterações na qualidade de vida, comprometimento cognitivo e da capacidade funcional, aumento do risco de quedas e fraturas, maior incidência de doenças cardiovasculares (DCV) e aumento da mortalidade. [64] Diagnosticar e corrigir a causa subjacente à anemia é, portanto, um aspeto importante no cuidado do doente idoso. [65]

Diversos estudos têm demonstrado que a anemia, definida pelos critérios da OMS, está associada com um aumento do risco de morte nos idosos. [8, 15] A maioria dos estudos [7, 8, 16] observou uma associação negativa entre os níveis de Hb e a mortalidade, com risco crescente em função da gravidade da anemia, embora alguns estudos não tenham encontrado associação entre valores de Hb baixos e aumento do risco de morte. [15, 66]

5.1. Complicações cardiovasculares

A anemia está associada a um aumento da mortalidade em idosos por enfarte agudo do miocárdio (EAM). Num estudo retrospetivo de mais de 75.000 doentes com idade superior a 65 anos internados com EAM, Wu *et al* [67] observaram um aumento de mortalidade, mesmo em doentes com anemia moderada (hematócrito (Hct) 36,1-39%). A transfusão sanguínea em doentes com um Hct <33% foi associada com uma redução da mortalidade.

Resultados recentes da *Evaluation of Losartan In The Elderly* (II ELITE) indicaram que a anemia é um preditor independente significativamente associado com a mortalidade em doentes com CHF (insuficiência cardíaca congestiva).[68]

Os resultados do *Heart and Soul Study* demonstraram que a anemia moderada e grave está fortemente associada com disfunção diastólica. [69] A anemia é também um fator de risco significativo para hipertrofia ventricular esquerda (LVH). [70]

A DCV é a principal causa de morbilidade e de mortalidade em doentes com insuficiência renal. Múltiplos fatores estão envolvidos no desenvolvimento de DCV em doentes com DRC, incluindo a anemia. [11]

Na ausência de DCV subjacente, a anemia grave pode levar a CHF. [71]

Na presença de doença cardíaca, especialmente doença da artéria coronária, a anemia pode piorar a angina de peito e pode contribuir para um aumento da incidência de outras complicações cardiovasculares. [72]

É bem conhecido que a anemia reduz a capacidade de transporte de oxigénio aos tecidos. O organismo tem vários mecanismos que interagem para compensar e manter a oxigenação tecidular adequada. Estes mecanismos podem ser classificados como mecanismos não-hemodinâmicos (ex. aumento da produção de Epo e do *turnover* de Hb) e mecanismos hemodinâmicos, os quais levam ao aumento do *output* cardíaco. [11]

Os mecanismos não-hemodinâmicos podem compensar a anemia num grau limitado e, portanto, são os mecanismos hemodinâmicos os mais importantes. Estes mecanismos são complexos e envolvem uma diminuição no "*afterload*" devido a vasodilatação, um aumento do "*preload*" devido ao aumento do retorno venoso, e a um aumento da função ventricular esquerda. (Figura 5) Embora estes mecanismos aumentem a oxigenação tecidular, levam a taquipneia, palpitações e dor de cabeça latejante. A longo prazo, o aumento do *output* cardíaco, causado por mecanismos compensatórios, pode levar a um desenvolvimento gradual de LVH. [72]

Em doentes com DRC, têm sido associados baixos níveis de Hb com um aumento do risco de LVH. A anemia parece ter um papel independente na génese de LVH e subsequente desenvolvimento de DCV. A intervenção precoce e a correção adequada da anemia é importante na prevenção e tratamento da DCV e DRC. [11]

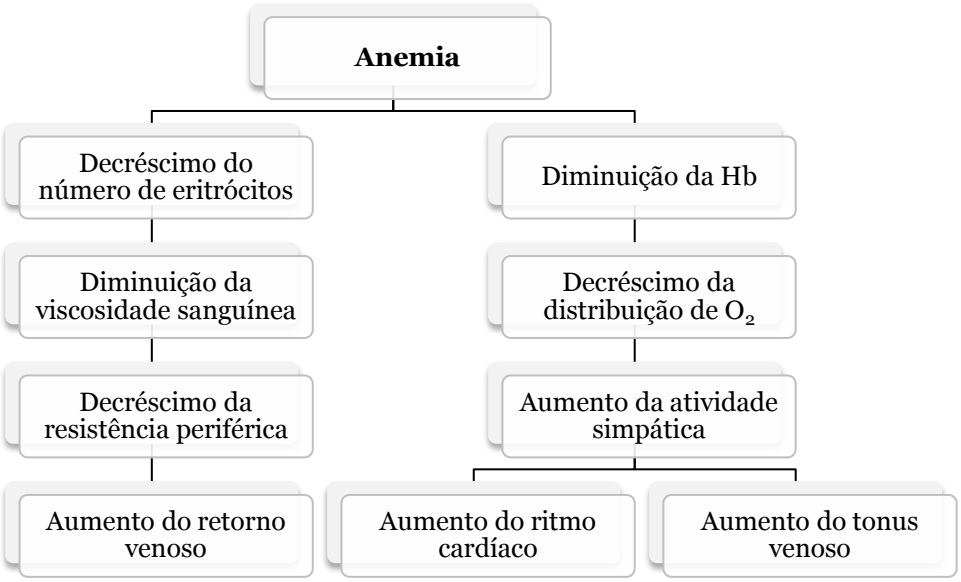


Figura 5 - Representação esquemática do mecanismo hemodinâmico para compensar a anemia. [adaptado de Metivier F *et al*, 2000] [72]

5.2. Alterações motoras

A anemia tem sido indicada como um fator de risco independente para quedas e fraturas em idosos. Para além da anemia, outros preditores independentes incluem a idade, sexo, estação do ano, área de residência, alcoolismo, demência, doença de Parkinson, problemas mecânicos ou motores, alteração da consciência, convulsões/epilepsia e glaucoma. [73]

A avaliação retrospetiva de 145 doentes com idades entre 60-97 anos, de lares de idosos e da comunidade, que foram hospitalizados por fratura do osso ilíaco indicou que este evento foi significativamente mais comum nos indivíduos com anemia (30% vs 13%). A análise dos resultados demonstrou uma associação entre a anemia e um aumento do risco

de quedas (três vezes maior). Além disso, o aumento de 1 g/dL na concentração de Hb foi associado com uma redução de 45% no risco de quedas com fraturas. [19]

5.3 Alterações na função cognitiva e neurológica

O comprometimento cognitivo é um problema extremamente comum na população idosa. De 536 indivíduos com idade ≥65 anos que viviam na comunidade ou em lares de idosos, o comprometimento cognitivo entre os homens anémicos e não anémicos foi de 55,6% e 34,4%, respetivamente; e de mulheres anémicas e não anémicas foi de 47,5% e 40,1%, respetivamente [74]

Dores de cabeça, perda de concentração e depressão, são sintomas neurológicos encontrados em doentes idosos com anemia. [11] Embora o conhecimento sobre os efeitos neurológicos específicos da anemia seja limitado, alguns estudos [75] conduzidos em doentes a fazer diálise renal têm mostrado que a presença de anemia parece contribuir para o comprometimento cognitivo funcional e que os doentes com DRC frequentemente sofrem de confusão, incapacidade de concentração, decréscimo da agilidade mental, e comprometimento da memória. O delírio é um sinal de alteração da homeostasia e do estado físico do doente. Numa investigação sobre os fatores de predisposição para delírio, numa unidade cirurgica de cuidados intensivos, verificou-se que a anemia estaria nos fatores preditivos de delírio, o que sugeria uma associação entre a doença de Alzheimer e a anemia em idosos. [11]

Os mecanismos exatos subjacentes aos efeitos específicos neurológicos da anemia não estão ainda completamente compreendidos, mas tem sido indicado que o aumento do fluxo sanguíneo cerebral induzido pela anemia pode resultar num aumento da distribuição de toxinas urémicas para o cérebro, em caso de insuficiência renal, ou que o comprometimento da distribuição de oxigénio para o cérebro pode afetar uma série de processos metabólicos importantes a nível cerebral. [11]

6. Diagnóstico e tratamento da anemia no idoso

➲ Diagnóstico da anemia no idoso

Considerando o aumento exponencial do número de indivíduos idosos na sociedade e a prevalência da anemia nesta faixa etária, a anemia nos idosos pode ter um impacto significativo nas necessidades e nos custos em saúde. O diagnóstico e tratamento adequados da anemia nos idosos são, portanto, de vital importância. Na prática clínica, os idosos com anemia são avaliados de modo a detetar e tratar a causa subjacente à anemia. (30)

A anamnese completa, a história alimentar, particularmente no que diz respeito a dietas vegetarianas estritas que aumentam o risco de deficiência em vitamina B12, o consumo de álcool (aumenta o risco de deficiência em folato), a poli-medicação (especial atenção para os fármacos que aumentam o risco de hemorragia, como os anti-inflamatórios não esteroides e para aqueles que podem diminuir a eritropoiese, causando anemia), a perda de peso e o exame físico detalhado, são outros aspetos a ter em consideração para o despiste das causas subjacentes ao desenvolvimento de anemia. (76, 77)

Uma história de longa data de anemia é sugestiva de etiologia hereditária, como talassemia e esferocitose hereditária. A perda de peso, linfadenopatia, localização de dor óssea e hepatoesplenomegalia podem denotar patologias inflamatórias ou neoplásicas. (78)

Depois do exame físico e avaliação clínica segue-se o diagnóstico laboratorial, que inclui o hemograma completo, o qual permite obter os parâmetros que definem a anemia, ou seja, a concentração de Hb, Hct, contagem de eritrócitos, e os índices hematimétricos [volume globular médio (VGM), concentração da hemoglobina globular média (CHGM), hemoglobina globular média (HGM)] e que permitirão classificar morfologicamente a anemia. (79) O *red cell distribution width* (RDW), também incluído no hemograma, permite avaliar a presença de anisocitose (variação de volume dos eritrócitos). A contagem do número absoluto de reticulócitos é importante para avaliar a produção medular de eritrócitos. (80)

Anemia microcítica

As anemias microcíticas são usualmente causadas por deficiência em ferro. A ferritina é um marcador das reservas de ferro, e um nível de ferritina abaixo de 35 ng/mL é altamente sugestivo de anemia por deficiência em ferro. É importante notar que os níveis de ferritina aumentam também com uma doença aguda ou inflamação. Indivíduos com anemia por deficiência em ferro e com um processo inflamatório agudo em atividade podem apresentar níveis de ferritina elevados, dificultando o diagnóstico de deficiência em

ferro. Um limite de 45 ng/mL tem alta sensibilidade em idosos. [78] O algoritmo para o diagnóstico de anemia microcítica está representado na figura 6.

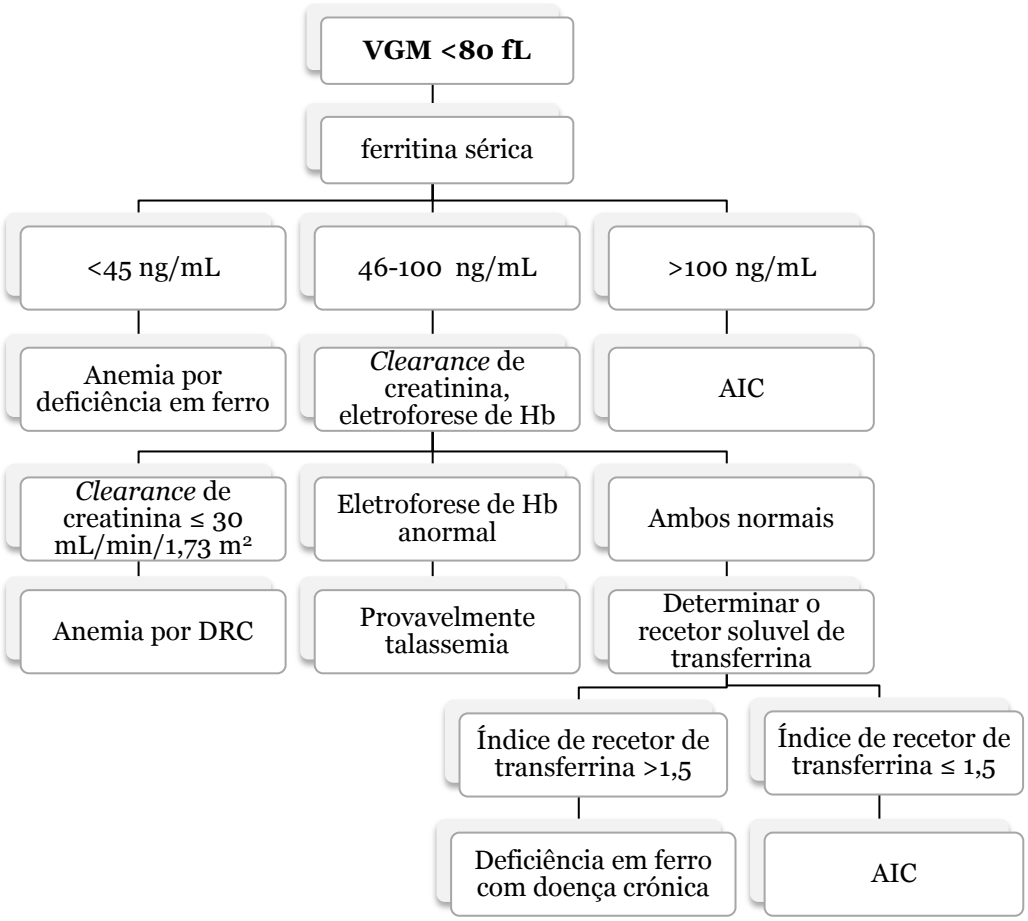


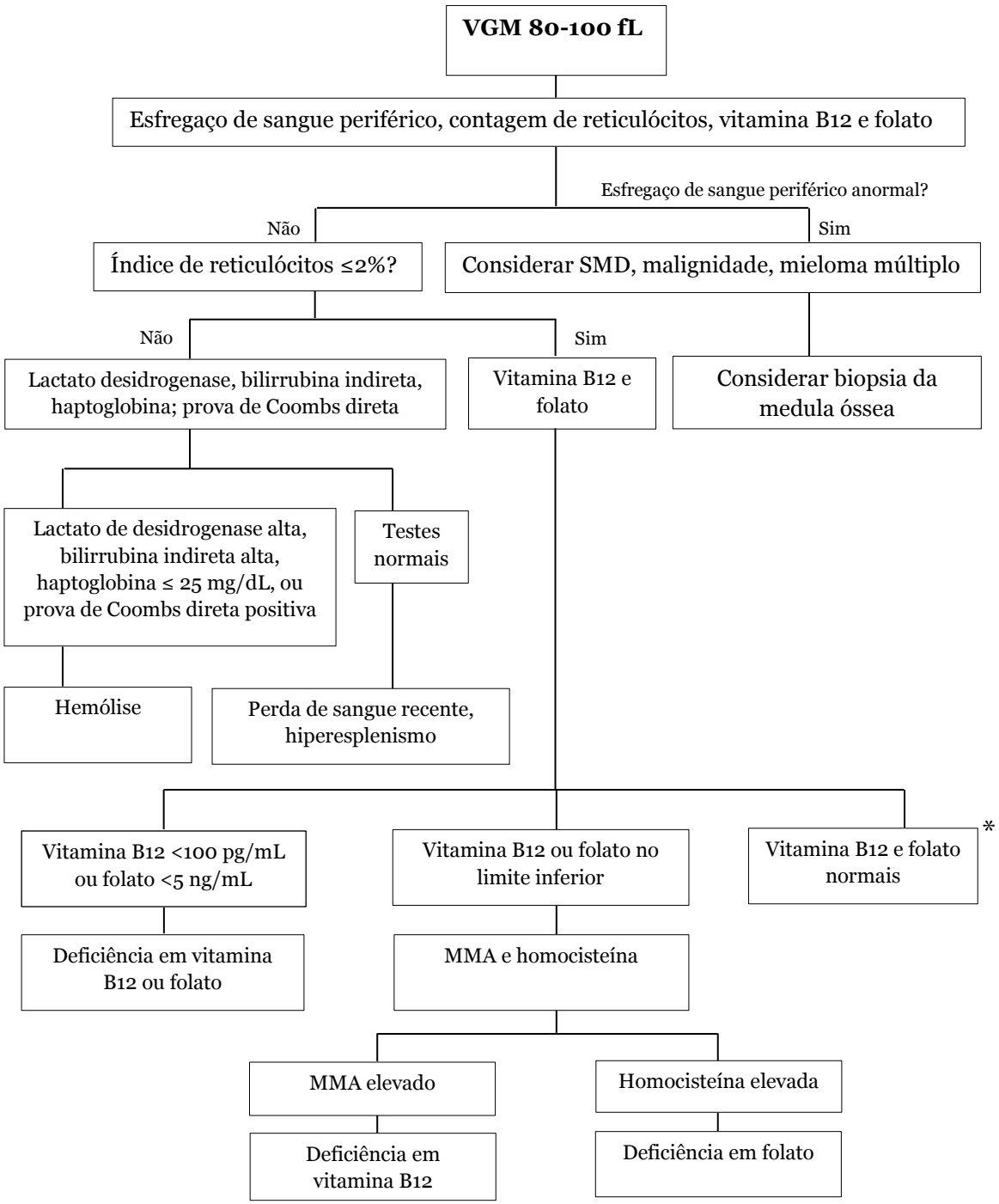
Figura 6 – Representação esquemática do diagnóstico de anemia microcítica no idoso. [adaptado de Bross MH *et al*, 2010] [78]

Anemia normocítica

As anemias normocíticas têm um vasto diagnóstico diferencial. Embora muitas anemias normocíticas sejam secundárias a doenças crónicas incluindo DRC, é importante excluir primeiramente a deficiência nutricional e a hemólise. [78]

O esfragaço de sangue periférico, a contagem de reticulócitos, os níveis de vitamina B12 e de folato devem ser requisitados. Muitos doentes com deficiência em vitamina B12 ou em folato têm um VGM normal. Se o índice de reticulócitos (reticulócitos x Hct doente/Hct médio) for maior que 2%, a hemólise e testes confirmatórios subsequentes devem ser considerados. Um resultado positivo da prova de Coombs direta, apoia fortemente uma anemia hemolítica autoimune. Outras causas de reticulocitose incluem perda de sangue recente e hiperesplenismo. Muitas pessoas com anemia têm uma baixa quantidade de reticulócitos, que indicam que a medula óssea não está a produzir eritrócitos adequadamente. Se os níveis de vitamina B12 e folato forem adequados, estes doentes devem ser avaliados para a anemia por deficiência em ferro e doença renal.

Muitos idosos têm mais do que uma etiologia para a anemia. O nível de recetor solúvel de transferrina está tipicamente aumentado para 2,5 mg/L ou mais na anemia por deficiência em ferro. Quando se divide o nível de recetor solúvel de transferrina pelo logaritmo do nível de ferritina (índice de recetor de transferrina), um valor de 1,5 ou menos sugere AIC e um valor acima de 1,5 suporta anemia ferripriva com doença crónica. [78] O algoritmo para o diagnóstico de anemia normocítica encontra-se na figura 7.


VGM 80-100 fL
Esfregaço de sangue periférico, contagem de reticulócitos, vitamina B12 e folato
Esfregaço de sangue periférico anormal?
Não
Sim
Índice de reticulócitos ≤2%?
Considerar SMD, malignidade, mieloma múltiplo
Não
Sim
Lactato desidrogenase, bilirrubina indireta, haptoglobina; prova de Coombs direta
Vitamina B12 e folato
Considerar biopsia da medula óssea
Lactato de desidrogenase alta, bilirrubina indireta alta, haptoglobina ≤ 25 mg/dL, ou prova de Coombs direta positiva
Testes normais
Hemólise
Perda de sangue recente, hiperesplenismo
Vitamina B12 <100 pg/mL ou folato <5 ng/mL
Vitamina B12 ou folato no limite inferior
Vitamina B12 e folato normais
*
Deficiência em vitamina B12 ou folato
MMA e homocisteína
MMA elevado
Homocisteína elevada
Deficiência em vitamina B12
Deficiência em folato

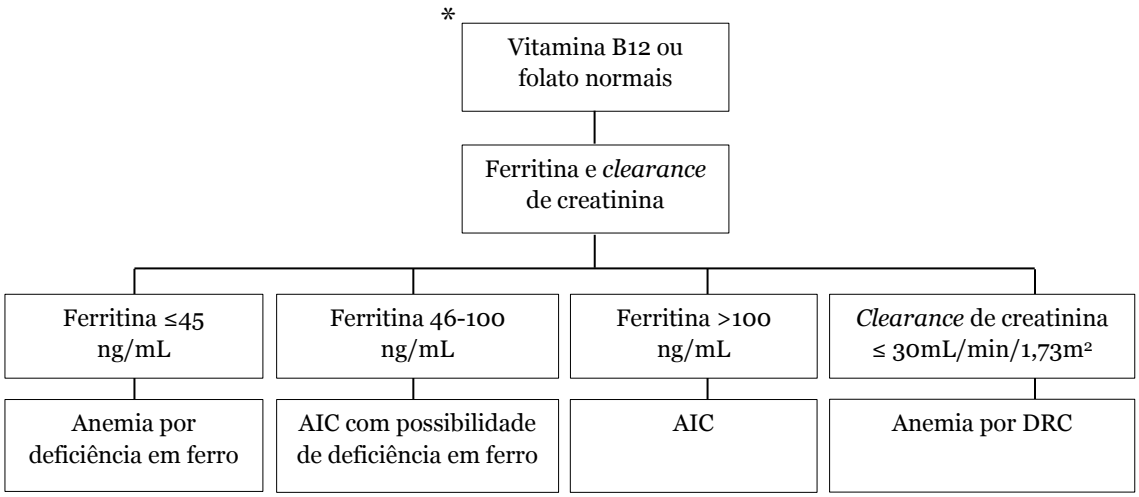


Figura 7 – Representação esquemática do diagnóstico de anemia normocítica no idoso. [adaptado de Bross MH *et al*, 2010] [78]

Anemia macrocítica

As anemias macrocíticas podem ser causadas por terapia medicamentosa, alcoolismo, doença hepática, hipotiroidismo, deficiência em vitamina B12 ou folato. Quando a contagem de reticulócitos é baixa, a etapa seguinte é obter os níveis séricos de vitamina B12 e de folato. Se os níveis de vitamina B12 ou folato estão no limite inferior, os níveis de homocisteína (confirmar deficiência em folato) e de MMA (confirmar deficiência em vitamina B12) devem ser obtidos. Um esfregaço de sangue periférico com resultado anormal em doentes com anemia pode sugerir SMD e malignidades como mieloma múltiplo. A anemia macrocítica pode estar associada com SMD e condições mieloproliferativas. Nestes casos, a biopsia da medula óssea deve ser considerada. [78] O algoritmo para o diagnóstico de anemia macrocítica está representado na figura 8.

Em 80% dos doentes é encontrada uma causa subjacente, o que permite iniciar o tratamento, prevenindo o agravamento da anemia e melhorando o prognóstico do doente. Os benefícios do diagnóstico e tratamento precoce da anemia são evidentes em doentes com insuficiência cardíaca crónica ou insuficiência renal, uma vez que permitem melhorar os efeitos adversos da anemia associados com essas perturbações. Por exemplo, estudos clínicos têm demonstrado que a correção parcial da anemia está associada com uma melhoria na LVH. Além disso, durante os últimos 10 anos, estudos clínicos em doentes em estadio final da doença renal (ESRD), suscetíveis ao desenvolvimento de complicações cardíacas, têm demonstrado que a correção da anemia melhora a função cardíaca e outros fatores, tais como a função cognitiva e a capacidade de exercício. Também foi observado que o sucesso do tratamento da anemia em doentes com CHF não só melhorou a função cardíaca, mas também reduziu a necessidade de diuréticos e de hospitalização. Além disso, os tratamentos que diminuem a fadiga e outros sintomas relacionados com a anemia podem ter um efeito positivo sobre a qualidade de vida. Todas estas evidências indicam

que o diagnóstico e tratamento de doentes com anemia são benéficos, melhorando a sua qualidade de vida, reduzindo a incidência de complicações cardiovasculares e da mortalidade associada, bem como da necessidade de hospitalizações e, por consequência reduzindo, os custos de saúde. [11]

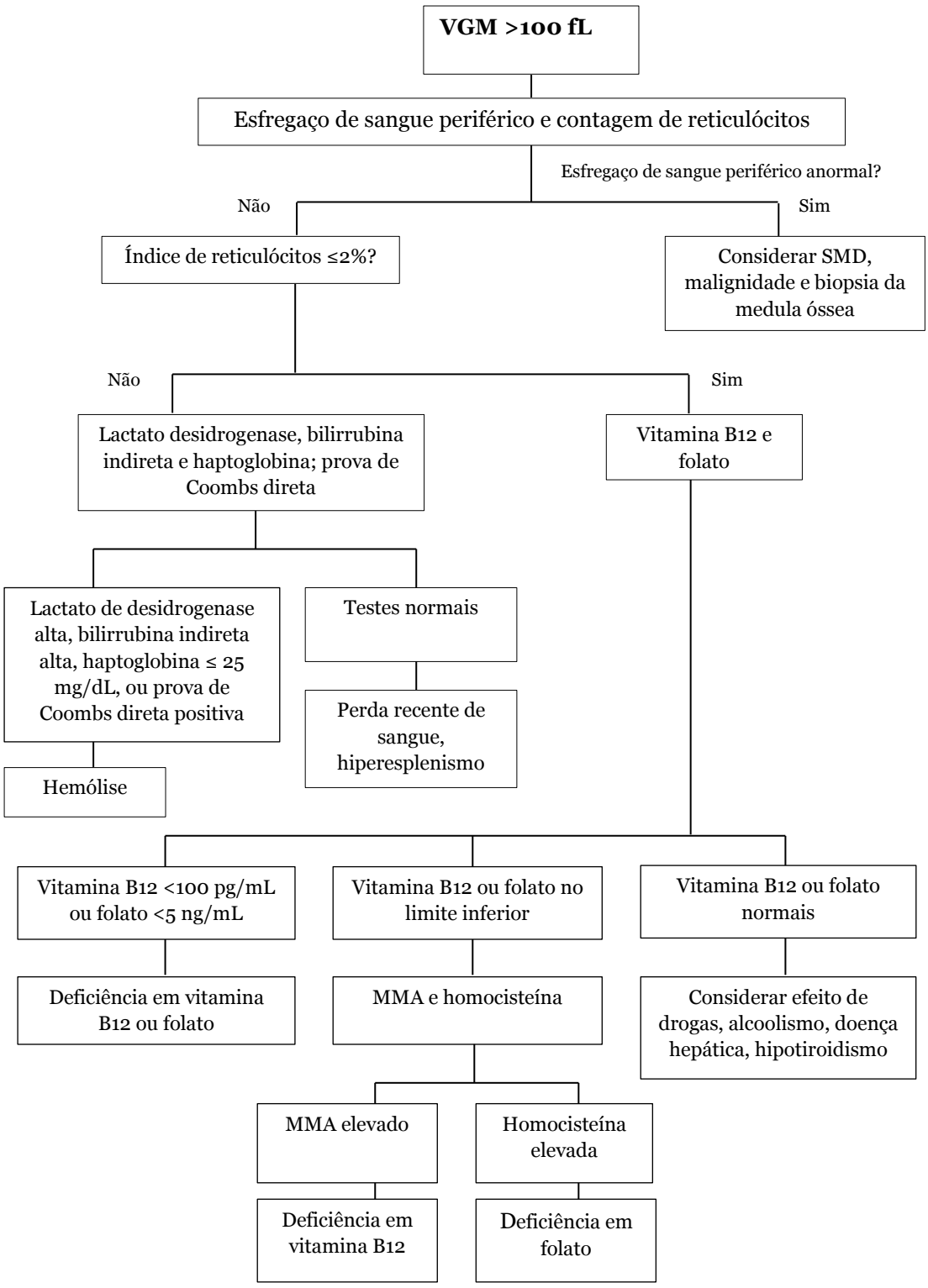

VGM >100 fL
Esfregaço de sangue periférico e contagem de reticulócitos
Esfregaço de sangue periférico anormal?
Não
Sim
Índice de reticulócitos ≤2%?
Considerar SMD, malignidade e biopsia da medula óssea
Não
Sim
Lactato desidrogenase, bilirrubina indireta e haptoglobina; prova de Coombs direta
Vitamina B12 e folato
Lactato de desidrogenase alta, bilirrubina indireta alta, haptoglobina ≤ 25 mg/dL, ou prova de Coombs direta positiva
Testes normais
Perda recente de sangue, hiperesplenismo
Hemólise
Vitamina B12 <100 pg/mL ou folato <5 ng/mL
Vitamina B12 ou folato no limite inferior
Vitamina B12 ou folato normais
Deficiência em vitamina B12 ou folato
MMA e homocisteína
Considerar efeito de drogas, alcoolismo, doença hepática, hipotiroidismo
MMA elevado
Homocisteína elevada
Deficiência em vitamina B12
Deficiência em folato

Figura 8 - Representação esquemática do diagnóstico de anemia macrocítica no idoso. [adaptado de Bross MH *et al*, 2010] [78]

➲ Tratamento dos diferentes tipos de anemia no idoso

- **Tratamento da anemia por deficiência nutricional (ferro, vitamina B12 e folato)**

Todos os indivíduos com anemia por deficiência nutricional devem ser tratados. [81]

Nos idosos com anemia por deficiência em ferro o tratamento é feito administrando uma dose de sulfato de ferro [325 mg (65 mg do elemento ferro) por dia], ou de gluconato de ferro [325 mg (38 mg do elemento ferro) por dia]. [81] A terapia com baixa dose de ferro (15 mg de ferro por dia) corrige eficazmente as concentrações de ferritina e de Hb, com menores efeitos gastrointestinais adversos, do que a terapia com altas doses de ferro. [82] O tratamento é feito durante seis meses, de modo a repor as reservas de ferro do organismo. Para os indivíduos que não respondem de forma adequada à terapêutica oral, pode fazer-se o tratamento por via parenteral, com ferro-dextran ou sacarose de ferro. [83]

O tratamento da anemia por deficiência em vitamina B12, por via oral, com cianocobalamina, 1 a 2 mg por dia é geralmente bem tolerado e eficaz. [83]

O tratamento da anemia por deficiência em ácido fólico é feito por administração de 1 mg de ácido fólico por dia. [78]

O tratamento adequado e eficaz das anemias por carência nutricional é confirmado pela reticulocitose ao fim de uma semana de tratamento e por um aumento gradual da concentração de Hb. [78]

- **Tratamento da anemia da inflamação crónica, anemia da doença renal crónica e anemia de causa inexplicada**

O tratamento da AIC, anemia da DRC e AI apresenta dificuldades. O tratamento inicial tem como objetivo tratar a doença subjacente. O tratamento adequado da doença crónica minimizará a inflamação, reduzindo a inibição da produção de células sanguíneas pela medula óssea. [78]

Quando a AIC no idoso é ligeira não requer intervenção terapêutica, no entanto, quando a sintomatologia é severa requer tratamento adicional. A transfusão sanguínea e a administração de agentes estimuladores da eritropoiese são duas opções terapêuticas para tratar a anemia severa, ambas tendo limitações significativas. A transfusão sanguínea providencia a perda dos sintomas comuns à anemia, incluindo dispneia, fadiga e tonturas. Os riscos da transfusão incluem hipervolémia, aumento das reservas de ferro, risco de infeções e de reações agudas. [78] Os agentes estimuladores da eritropoiese foram aprovados para o tratamento da AIC em algumas situações, mas o seu uso permanece controverso. Dois estudos recentes sobre agentes estimuladores da eritropoiese em indivíduos com anemia por DRC verificaram que o aumento dos níveis de Hb para valores

de 13,5 g/dL [84] ou de 13 g/dL [85] resultou num aumento da taxa de morte e de eventos cardiovasculares.

Embora alguns estudos tenham mostrado benefícios com a terapêutica com agentes estimuladores da eritropoiese em indivíduos com cancro e anemia, outros referem um decréscimo da sobrevivência destes doentes quando tratados com estes agentes. Em caso de anemia associada à quimioterapia, os agentes estimuladores da eritropoiese são recomendados para níveis de Hb abaixo de 10 g/dL, para evitar a transfusão de concentrado eritrocitário. [86]

É prudente limitar o tratamento com agentes estimuladores da eritropoiese às anemias severas associadas com DRC e a outras indicações protocoladas (tabela 4), a menos que os doentes façam parte de estudos clínicos para avaliar os riscos/benefícios dos agentes estimuladores da eritropoiese. [78]

Tabela 4 – *Guidelines* para a utilização dos agentes estimuladores da eritropoiese em indivíduos com anemia. [adaptado de Bross MH *et al*, 2010] [78]

***Guidelines* para o uso dos agentes estimuladores da eritropoiese em doentes com anemia**
Indicações aprovadas pela U.S. FDA (*Food and Drug Administration)*
• Indivíduos com anemia por DRC submetidos a diálise, para manter o nível de Hb entre 10 e 12 g/dL; • Indivíduos com nível de Hb abaixo de 10 g/dL que estão a fazer quimioterapia para cancro; • Indivíduos com VIH e anemia secundária à terapia com *zidovuline* (Retrovir); • Indivíduos com anemia, com cirurgia agendada, que estão em risco de necessitar de uma cirurgia associada a transfusão sanguínea (apenas a epoetina alfa).
Outras indicações referidas pela Medicare
• Certos indivíduos com SMD; • Indivíduos sob tratamento para hepatite C; • Doença intestinal crónica; • Artrite reumatoide; • Lúpus eritematoso sistémico.

A Epo recombinante humana (rhEpo) foi aprovada pela FDA para uso clínico em 1993. [62] As rhEpo aprovadas pela *European Medicines Agency* (EMA) e utilizadas na clínica em Portugal são a epoetina alfa, epoetina beta, epoetina zeta, epoetina teta, darbepoetina alfa e a *Metoxy-polyethylene glycol-epoietin* beta. [87, 88]

Estas rhEpo são produzidas usando tecnologia de DNA recombinante em linhas celulares de ovário de hamsters chineses, e têm uma estrutura de glicosilação que difere da Epo humana endógena. Apesar das diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, considera-se que todos estes produtos têm eficácia clínica semelhante. [62]

7. Patologias associadas ao envelhecimento

A utilização de meios para melhorar a qualidade de vida e para controlar a morbilidade na população idosa fez com que o número de idosos aumentasse de forma expansiva nos últimos tempos. A recente transformação populacional de alta fecundidade e de alta mortalidade para reduzida fecundidade e cada vez mais baixa mortalidade, fenómeno denominado transição demográfica, favoreceu o aumento progressivo da população idosa. (89)

Ainda que envelhecer e adoecer não sejam sinónimos, sabe-se que o aumento da idade promove alterações anatómicas e fisiológicas que tornam os idosos mais vulneráveis ao aparecimento de DCV, doenças respiratórias, neoplásicas, cerebrovasculares, osteoarticulares, renais e endócrinas, que podem ou não estar associadas. (89)

7.1. Doenças cardiovasculares

A idade pode ser interpretada como um aumento do tempo de exposição aos fatores tradicionais de risco para DCV, como hipertensão, diabetes, tabagismo, dislipidemia e sedentarismo. Com a idade, as alterações na estrutura e funcionalidade cardiovascular podem potenciar os efeitos dos fatores de risco tradicionais. Assim, o aumento das DCV observado em pessoas mais velhas pode ser visto como uma interação entre a idade (tempo de exposição), fatores de risco cardiovasculares e predisposição genética. (90) O aumento da prevalência de doença vascular com o envelhecimento está associado com um aumento concomitante da prevalência de DRC. (91)

7.2. Diabetes *Mellitus*

A prevalência da diabetes *Mellitus* nos idosos pode variar entre 20 a 30%. Na nona década de vida, 50% dos indivíduos poderão apresentar alterações na tolerância à glicose, podendo necessitar de terapêutica com insulina. Atualmente, a diabetes é a causa mais frequente de DRC nos Estados Unidos, quer na população geral quer na idosa. (92)

7.3. Hipertensão arterial sistémica

Em todo o mundo, mais de metade dos idosos são hipertensos. Nos Estados Unidos, aproximadamente 50% dos indivíduos com idade superior a 65 anos apresentam um aumento da pressão arterial sistólica (PAS) e/ou diastólica (PAD), com graves consequências sistémicas, como EAM, insuficiência cardíaca, doença vascular periférica e insuficiência renal. A diminuição da elasticidade dos vasos, o aumento de aterosclerose com consequente aumento da resistência vascular periférica, a diminuição da função β-adrenérgica, permanecendo normal a função α-adrenérgica, são das principais alterações fisiopatológicas responsáveis pela presença de hipertensão no idoso. (92)

7.4. Glomerulopatias

De entre as causas mais comuns de doença renal primária destacam-se a glomerulonefrite membranosa (45%) e a glomerulonefrite de lesões mínimas (16%). No que diz respeito às causas secundárias, destacam-se a diabetes, vasculite e amiloidose. A proteinúria é usualmente um bom marcador de doença glomerular e torna-se mais protuberante nos doentes com hipertensão arterial, aumentando a taxa de morbilidade e mortalidade neste grupo. [92]

7.5. Infeção do trato urinário

A bacteriúria assintomática e sintomática apresentam elevada frequência na população idosa. Existem várias razões para este facto, tais como, uropatia obstrutiva, perda de atividade bactericida da secreção prostática, prolapsos, incontinência fecal, demência, doença neuromuscular, cateterização vesical e menor produção de proteína de *Tamm-Horsfall.* [92]

7.6. Alterações na função endócrina

Com a idade ocorrem diversas alterações na função endócrina, incluindo o decréscimo de testosterona e dos níveis de hormona do crescimento. [48]

7.6.1. Insuficiência androgénica

Os androgénios têm um efeito estimulador sobre a eritropoiese, sendo o tratamento hormonal eficaz para alguns doentes com anemia hipoplástica ou aplástica. Os doentes com deficiência em androgénios, observada depois de orquiectomia ou após o término de terapêutica androgénica para cancro da próstata, apresentam uma queda no nível de Hb, sendo esta diminuição mais acentuada nos doentes com restrição hormonal completa e radioterapia. Assim, o declínio de androgénios que se observa com a idade contribui provavelmente para aumentar a redução da massa eritroide e, portanto, para o desenvolvimento de anemia. [9]

Ferrucci *et al* [93] , no estudo InCHIANTI, avaliaram o nível de testosterona em 905 participantes, um estudo epidemiológico de coorte em homens e mulheres com idade ≥ 65 anos. Para ambos os sexos houve uma relação linear entre os níveis de testosterona e de Hb. No entanto, embora a associação entre os baixos níveis de testosterona e os baixos níveis de Hb fosse estatisticamente significativa, alguns participantes com baixos níveis de testosterona não apresentavam anemia e alguns que eram anémicos tinham níveis normais de testosterona. Mas, para os indivíduos que tinham baixo nível de testosterona mas não tinham anemia até ao momento inicial da avaliação, observou-se um aumento do risco de anemia, evidenciado pela reavaliação efetuada 3 anos depois. Assim, o declínio

nos níveis séricos de testosterona, relacionado com a idade, é, provavelmente, um fator de risco para AI. Os autores do estudo sugerem que os baixos níveis de testosterona devem ser considerados como uma causa de anemia em idosos, especialmente quando outras causas plausíveis foram excluídas e em indivíduos com défices nutricionais nos quais a suplementação com ferro e vitaminas é ineficaz.

7.6.2. Decréscimo da hormona do crescimento

A secreção da hormona do crescimento diminui com a idade. O efeito desta hormona na eritropoiese parece ser mediado pelo *insulin-like growth factor*-I. Atua inibindo a apoptose e potenciando os efeitos da Epo e de outras citocinas. A hormona do crescimento pode levar ao aumento dos níveis de Epo, possivelmente por estimular a sua síntese hepática. A administração da hormona do crescimento condiciona a melhoria na anemia em ratos hipofisectomisados, e em crianças e adultos com deficiência nesta hormona. A hormona do crescimento pode também afetar o volume plasmático. [48] Num estudo em adultos deficientes em hormona do crescimento a administração da mesma levou a um aumento na massa eritroide com decréscimo no VGM, HGM e níveis séricos de ferritina, embora a concentração de Hb não tenha sofrido alterações significativas [94] Assim, o impacto da diminuição da hormona do crescimento na eritropoiese, em idosos, e o seu papel no desenvolvimento da anemia requer mais estudos. [48]

8. Alterações vasculares e renais associadas ao envelhecimento

A idade cronológica pode ser diferente da idade biológica. Certas variáveis biológicas, como envelhecimento capilar, elasticidade da pele e função arterial (envelhecimento vascular) correlacionam-se, de uma forma linear, com a idade cronológica, enquanto outros marcadores biológicos, tais como a capacidade pulmonar, audição e função cognitiva, bem como a acuidade visual não estão necessariamente associados com a idade cronológica. (90)

8.1. Alterações vasculares

O sistema arterial consiste numa rede de grandes artérias elásticas, pequenas e médias artérias de alta resistência e arteríolas. As grandes artérias elásticas, em virtude da sua distensibilidade, convertem a saída pulsátil do sangue do coração num padrão contínuo de fluxo de sangue periférico. As pequenas artérias e arteríolas são os principais determinantes da resistência vascular periférica. Com o aumento da idade, a túnica íntima arterial torna-se menos lisa e apresenta disfunção endotelial. Na túnica média, ocorre proliferação de células musculares lisas, uma redução do teor de elastina, e fibrose progressiva adventícia e média. Essas mudanças levam a um aumento da espessura da túnica íntima-média, calcificações vasculares da parede, bem como a rigidez, levando à perda de *compliance* da aorta e artérias principais. O aumento da espessura da túnica íntima pode representar um estadio inicial de aterosclerose e pode ser um preditor de eventos cardiovasculares futuros. No entanto, tem vindo a ser demonstrado que há um aumento da espessura da túnica íntima dependente da idade em humanos, na ausência de aterosclerose; assim o excessivo espessamento da túnica íntima pode não representar aterosclerose precoce, podendo apenas refletir envelhecimento arterial. Por outro lado, o aumento da rigidez e perda de *compliance* das artérias principais leva a um aumento da PAS e diminuição da PAD, o que desempenha um papel fisiopatológico central na hipertensão sistólica em idosos. Uma combinação de alterações vasculares relacionadas com a idade (espessamento da íntima e da média, rigidez da parede, dilatação do lúmen, e *compliance* diminuída), ocorrendo em diferentes graus, determina o envelhecimento vascular global do indivíduo. Combinações suaves podem representar envelhecimento vascular saudável, enquanto combinações graves e progressivas, associadas à exposição a fatores de risco cardiovascular tradicionais, podem levar a envelhecimento patológico. A aterosclerose pode ser vista não como uma doença específica, mas como uma interação entre combinações de alterações vasculares, relacionadas com a idade, e de fatores de risco para a aterosclerose. Por outras palavras, as piores combinações de alterações vasculares,

relacionadas com a idade, proporcionam o substrato apropriado para os fatores de risco cardiovascular tradicionais promoverem a DCV. As variações individuais que ocorrem nas alterações vasculares, relacionadas com a idade, podem ser geneticamente programadas e/ou determinadas durante a vida fetal ou influenciadas por padrões adversos de crescimento na vida precoce pós-natal. (90)

8.2. Alterações renais

Os rins constituem o sistema purificador do organismo, removendo do sangue os produtos de degradação, muitos dos quais apresentam toxicidade. Aproximadamente um terço do rim é suficiente para manter a homeostase. Mesmo após lesões externas ligeiras, os rins mantêm a capacidade de levar a cabo as funções necessárias à vida. No entanto, se as lesões se agravarem, poderão levar à morte, se não for realizado tratamento médico adequado. Estes órgãos têm diversas funções, tais como, filtração do sangue, regulação do volume sanguíneo, regulação da concentração de solutos no sangue, regulação do pH do líquido extracelular, regulação da produção de eritrócitos através da síntese de Epo e síntese de vitamina D. (95)

Ao longo da vida os rins sofrem várias alterações histológicas e fisiológicas que fazem o rim envelhecido diferente do rim jovem e podem conduzir a diversas condições clínicas observadas na população idosa. (96)

O envelhecimento está associado com mudanças estruturais renais e declínio funcional. Ainda não está muito claro quanto da perda funcional é devida à idade e quanta está relacionada com DCV e exposição a fatores de risco vasculares (hipertensão, diabetes e tabagismo). As principais características histológicas do envelhecimento renal são a fibrose arterial da túnica íntima, bem como glomeruloesclerose, atrofia tubular e fibrose intersticial. (97) No córtex renal há uma perda da massa renal com o envelhecimento. A incidência de glomerulosclerose no córtex renal aumenta até 5% em indivíduos com 40 anos de idade e até 30% em indivíduos na 8ª década de vida. Estas alterações estão associadas com um aumento simultâneo da espessura vascular, hialinose arterial e arteriolar e esclerose. Na medula renal, a glomeruloesclerose é acompanhada pela formação de um canal direto entre as arteríolas aferentes e eferentes, mantendo o fluxo de sangue medular e ignorando o glomérulo, levando a isquemia e redução funcional (circulação aglomerular). Assim, uma combinação de glomerulopenia funcional e glomeruloesclerose estrutural leva a progressiva redução na TFG, com a idade. (90)

Rule *et al* (98) verificaram que a prevalência de glomeruloesclerose em pessoas saudáveis (dadores de rim) era de 2,7, 16, 44, 58, e 73% para os muito jovens, jovens, adultos, velhos e muito velhos, respetivamente, sugerindo que nem a função renal nem os

fatores de risco para DRC podem explicar a forte associação entre a idade e a glomerulosclerose.

Os idosos sofrem frequentemente comorbilidades, que podem ter um efeito aditivo nas alterações da estrutura e função renal, o que pode confundir e amplificar o efeito da idade, por si só, sobre a estrutura e funcionalidade renal. No entanto, mesmo com DCV, nem todos os idosos apresentam um declínio da função renal, com a idade. [90] Os resultados do *Cardiovascular Health Study* indicam pouca ou nenhuma progressão da DRC na maioria dos idosos (aumento de creatinina no soro superior a 26,5 μmol/L em menos de 3% dos indivíduos com idade média de 73 anos). [99]

Fliser *et al* [100] observaram que a TFG (embora baixe em idosos quando comparada com jovens) permaneceu dentro do intervalo normal em idosos normotensos com dieta proteica normal, e concluiu que a idade, por si só, não é o principal determinante do declínio da TFG com o envelhecimento. [100]

Em suma, a patogénese do envelhecimento renal, com as suas alterações estruturais e funcionais associadas, não está claramente compreendida, principalmente devido à dificuldade em analisar o efeito do "envelhecimento natural" e os efeitos cumulativos de toxinas e doenças que possam danificar o rim durante a vida. A senescência replicativa e o *stress* oxidativo são os principais fatores identificados no processo de envelhecimento renal natural. Estes fatores, bem como doenças renais e toxinas, podem levar a alterações no sistema arterial renal, a mais importante das quais é a esclerose arterial renal. Sugere-se que o meio hipóxico/isquémico criado por esta arteriopatia produz as alterações morfológicas renais relacionadas com o envelhecimento de esclerose glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial. A subsequente insuficiência funcional conduz ao retorno do sistema renina-angiotensina-aldosterona para produzir hipertensão, que então cria um ciclo de novos danos arterial e arteriolar e isquemia renal. O esquema indicado na figura 9 é complicado por fatores, tais como o género, a síntese e inibição de óxido nítrico, sistema renina-angiotensina, fatores alimentares (isto é, a quantidade de sal e de restrição calórica), e o efeito dos genes associados ao envelhecimento. [97]

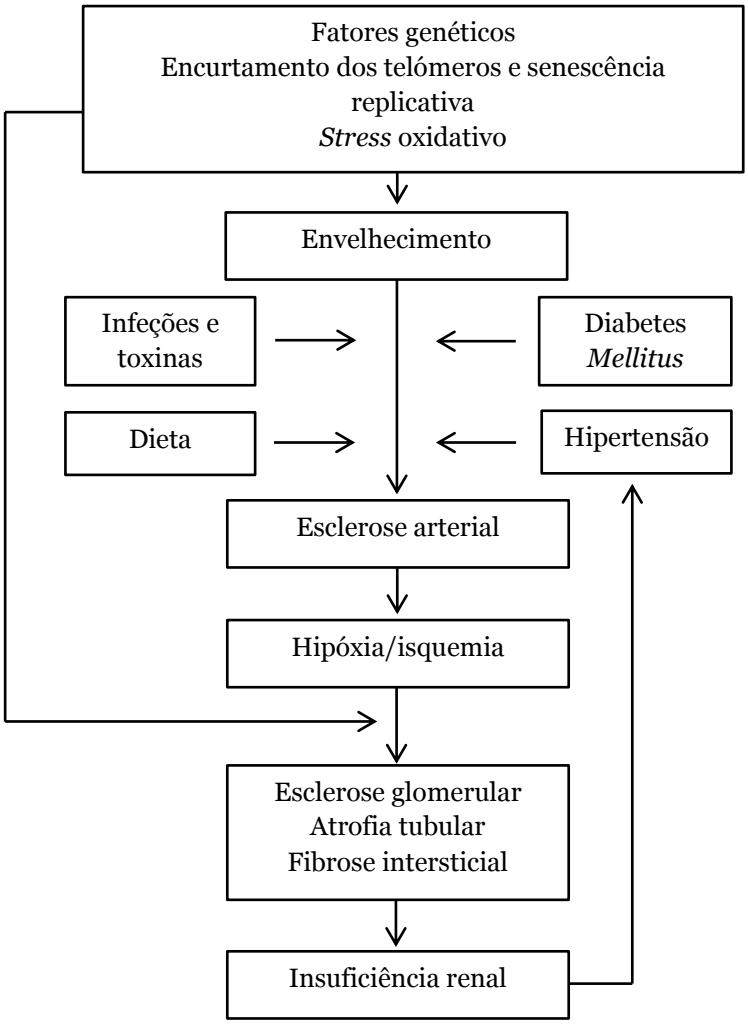


Figura 9 - Representação esquemática da patogénese proposta para o envelhecimento renal e lesão renal associada. [adaptado de Zhou XJ *et al*, 2008] [97]

A DRC é considerada um problema de saúde pública, crescente em todo o mundo [101], sendo definida por uma TFG abaixo dos 60 mL/min/1,73m², ou uma TFG normal associada a uma evidência de lesão renal (albuminúria, hematúria ou ecografia renal anormal por três ou mais meses consecutivos), independentemente da idade. A severidade da DRC é classificada de acordo com o nível da TFG, independentemente da etiologia, em 5 estadios. [101, 102] (Tabela 5)

Tabela 5 - Classificação da DRC em cinco estadios, de acordo com a TFG e complicações associadas a cada um dos estadios. [adaptado de Fluck R, 2008] [102]

Estadios	Definição	Complicações associadas
1	Lesão renal[1] com TFG normal ou aumentada (≥90 mL/min/1,73m²)	Hipertensão frequente.
2	Lesão renal com um decréscimo suave na TFG (60-89 mL/min/1,73m²) e outras evidências de lesão renal crónica[1]	Hipertensão, ligeiro aumento da hormona da paratiroide (PTH).
3	Comprometimento renal moderado, com decréscimo moderado na TFG (30-59 mL/min/1,73m²): menor risco (TFG 45-59 mL/min/1,73 m²); maior risco (TFG 30-44 mL/min/1,73 m²).	Hipertensão, decréscimo da absorção de cálcio, redução da excreção de fosfato, aumento acentuado da PTH, alteração do metabolismo das lipoproteínas, redução espontânea da ingestão proteica, anemia renal, LVH.
4	Lesão renal grave, com decréscimo acentuado na TFG (15-29 mL/min/1,73m²)	As mesmas complicações que no estadio 3, mas mais pronunciadas: acidose metabólica, hipercalémia, decréscimo da líbido.
5	Insuficiência renal (<15 mL/min/1,73m²).	As mesmas que no estadio 4, mas com maior severidade: retenção de sal e água, causando falência cardíaca aparente, anorexia, vómitos, prurido.

A prevalência de DRC na população idosa tem aumentado nos últimos anos. Na Europa ocorreu um aumento da incidência de DRC dependente da idade, com uma taxa de incidência sete vezes superior em idosos com mais de 75 anos relativamente a doentes entre os 20 e os 39 anos e mais do dobro dos doentes com idades compreendidas entre os 40 e 59 anos. [103]

O NHANES III, usando uma amostra representativa de adultos dos Estados Unidos, entre 1988 e 1994, revelou que 7,6% dos indivíduos com idade entre 60-69 anos, 25,9% de pessoas com pelo menos 75 anos, em oposição a apenas 1,8% das pessoas com idade entre 40-59 anos e 0,2% daqueles com idade menor que 40 anos, tinham uma TFG de 15-60 mL/min/1,73m². [101]

Nos Estados Unidos o número de pessoas diagnosticadas com ESRD duplicou nos últimos dez anos e um número relativamente elevado de pessoas recentemente diagnosticadas com DRC corresponde a idosos. [104] Esta tendência de aumento é bem conhecida em todo o mundo. [105]

[1] Outras evidências de lesão renal são microalbubinúria persistente, proteinúria persistente, hematúria persistente, anomalias estruturais nos rins verificadas radiologicamente e glomerulonefrite crónica.

O conhecimento da taxa de progressão de DRC permitirá uma prestação de cuidados mais direcionada, particularmente em indivíduos mais velhos. [106]

A classificação da DRC é aplicável a todos os grupos etários, não considerando o facto de a TFG decrescer gradualmente com a idade. A redução da TFG, com a idade, está associada com uma capacidade de concentração comprometida, esclerose vascular e glomerular global, atrofia tubular, com diminuição do espessamento do córtex renal e redução do tamanho renal. Estas alterações são consideradas patológicas, se observadas em indivíduos jovens. [107, 108]

As DCV têm um impacto significativo na DRC em idosos e afetam a sua progressão. [109] A microalbuminuria e a TFG baixa são muito comuns em indivíduos com idade superior a 65 anos, contribuindo para uma larga prevalência da DRC nesta faixa etária. Existem evidências de que a microalbuminuria é um forte preditor de risco de DCV na população em geral. Não está claro, contudo, se a microalbuminúria nos doentes com DRC precoce é um marcador de lesão renal ou de DCV, incluindo a aterosclerose e a doença vascular periférica, que são comuns nos idosos. [101]

Não está ainda definido se a DRC nos idosos é simplesmente devida a alterações na função renal relacionadas com a idade, ou se é uma doença renal genuína que progride para o ESRD. Uma minoria dos doentes idosos com DRC progride para ESRD e a maioria tem morbilidades e mortalidade relacionadas preferencialmente com DCV. [110]

Os fatores de risco para a iniciação e progressão da DRC estabelecidos até ao momento estão indicados na figura 10.

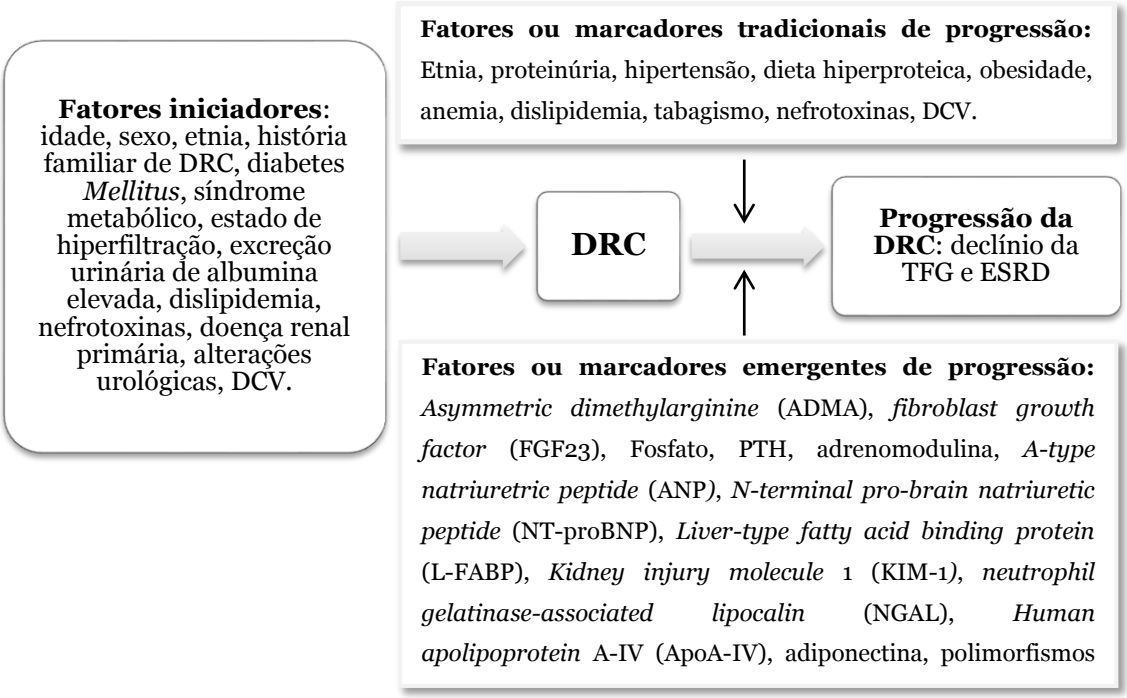

Fatores iniciadores: idade, sexo, etnia, história familiar de DRC, diabetes *Mellitus*, síndrome metabólico, estado de hiperfiltração, excreção urinária de albumina elevada, dislipidemia, nefrotoxinas, doença renal primária, alterações urológicas, DCV.
Fatores ou marcadores tradicionais de progressão: Etnia, proteinúria, hipertensão, dieta hiperproteica, obesidade, anemia, dislipidemia, tabagismo, nefrotoxinas, DCV.
DRC
Progressão da DRC: declínio da TFG e ESRD
Fatores ou marcadores emergentes de progressão: *Asymmetric dimethylarginine* (ADMA), *fibroblast growth factor* (FGF23), Fosfato, PTH, adrenomodulina, *A-type natriuretric peptide* (ANP), *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (NT-proBNP), *Liver-type fatty acid binding protein* (L-FABP), *Kidney injury molecule* 1 (KIM-1), *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL), *Human apolipoprotein* A-IV (ApoA-IV), adiponectina, polimorfismos

Figura 10 - Fatores e marcadores de risco para a iniciação e progressão da DRC. [adaptado de Kronenberg F, 2009] [111]

Considerando que a determinação da TFG, usada no diagnóstico da DRC, se baseia na medição da depuração de um marcador endógeno ou exógeno, as medições de creatinina ou de outros marcadores, como a cistatina C (inibidor de protease de cisteína produzido por todas as células nucleadas e filtrada livremente pelo glomerulo renal) ou a BTP (glicoproteína derivada da família das proteínas lipocalina) no soro, permite detetar a acumulação de substâncias normalmente removidas por filtração glomerular. A concentração sérica de creatinina aumenta quando a função renal está reduzida em pelo menos 50%. A cistatina C e a BTP são considerados marcadores mais sensíveis da função glomerular em comparação com a creatinina, porque detetam deteriorações iniciais pequenas na função renal, naquele que é chamado de intervalo de creatinina-cego. [112]

Diferentes sociedades científicas têm sugerido diferentes equações para determinar a TFG a partir de marcadores endógenos de filtração glomerular, como a creatinina sérica, com o objetivo de melhorar a relação entre a creatinina sérica e a filtração glomerular, e alertar os médicos para situações de doença renal. [113, 114]

A escolha da equação MDRD [115], sugerida pelo estudo *Modification of Diet Renal Disease* que incluiu dados sobre a idade, sexo, etnia e creatinina sérica, tem sido a mais utilizada, tanto na prática clínica como em estudos epidemiológicos. [113, 116, 117] O grupo de trabalho *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) desenvolveu recentemente uma nova equação para estimar a TFG com a finalidade de minimizar os erros da equação anterior. Esta equação foi determinada a partir de uma população de indivíduos provenientes de dez estudos diferentes, incluindo o estudo MDRD, [115] e aplica diferentes coeficientes das 4 variáveis usadas na equação MDRD (idade, sexo, raça e nível sérico de creatinina). [118] Esta nova equação permite melhorar a precisão e exatidão da medição da TFG relativamente ao observado pela equação MDRD, especialmente para valores de TFG superiores a 60 mL/min/1,73m^2. Por este motivo, os seus autores sugerem que a equação MDRD poderia ser substituída pela equação CKD-EPI, na prática clínica. [115]

A equação CKD-EPI avalia mais corretamente o risco de mortalidade e ESRD comparativamente com a MDRD. Dada a mais correta avaliação da TFG [118] e melhor categorização do risco pela equação CKD-EPI, sem custos laboratoriais adicionais, a sua implementação para estimar a TFG poderá contribuir para uma distribuição mais adequada dos recursos de saúde, prevenção mais específica e tratamento de complicações renais. [119]

Álvarez - Gregori *et al* [120] desenvolveram recentemente um método (fórmula HUGE) para diferenciar a DRC da diminuição da TFG associada com o processo de envelhecimento renal e da que resulta de um processo de doença. Esta fórmula inclui o Hct, ureia sanguínea e género e diagnostica DRC independentemente das variáveis da

idade, creatinina sérica, *clearance* de creatinina, ou TFG estimada [Fórmula HUGE: L=2.51-(0.26 x Hct+(0.12 x ureia (mg/dL))) (+1.38 se homens); se L for um número negativo, o indivíduo não tem DRC; se L for um número positivo, o indivíduo tem DRC]. Os autores têm demonstrado que a fórmula HUGE é mais consistente do que as equações MDRD e CKD-EPI, particularmente em pessoas com idade acima dos 70 anos. Contudo este método não foi validado por outros investigadores.

Como já foi referido, a DRC é comum nos idosos e é uma importante causa de anemia nesta população.

Um inquérito a 5222 doentes dos Estados Unidos principalmente idosos (idade média de 68,2 anos) com DRC constatou que 47,7% apresentaram Hb ≤12 g/dL e que a prevalência de anemia aumentou de 26,7% para 75,5%, quando a TFG caiu de ≥60 mL/min/1,73 m² para <15 mL/min/1,73 m². [121]

A principal causa de anemia na DRC é um declínio progressivo na produção renal de Epo. [89] É possível que o aumento de citocinas pró-inflamatórias que ocorre na DRC possa também contribuir para a patogénese da anemia nesta população de doentes. [90]

A Epo, uma hormona glicoproteica acídica, é o principal regulador da eritropoiese e é produzida principalmente pelas células tubulares renais, mas também pelo fígado, em resposta à hipóxia. A Epo liga-se a recetores polipeptídicos (EpoR) na superfície das células progenitoras eritroides, estimulando a sua proliferação, sobrevivência e diferenciação. [62]

Estudos transversais em indivíduos idosos não anémicos têm mostrado resultados contraditórios relativamente aos níveis de Epo; alguns estudos referem não haver diferença significativa nos níveis de Epo em comparação com jovens não-anémicos controlos, enquanto outros referem que os níveis de Epo estão significativamente aumentados em idosos em comparação com controlos jovens. [48] No entanto, os níveis de Epo em idosos anémicos são descritos como inapropriadamente baixos ou atenuados quando interpretados no contexto da sua Hb. Esta premissa baseia-se numa comparação dos níveis de Epo séricos de indivíduos idosos com anemia crónica com os de adultos anémicos mais novos e com os de idosos apenas com deficiência em ferro. [19]

A alteração na síntese de Epo pode ser mediada por comorbilidades como a diabetes e hipertensão, doenças comuns em idosos. [48] Embora existam resultados contraditórios, uma grande parte das evidências sugerem que a hipertensão e particularmente a diabetes estão associadas com níveis diminuídos de Epo em idosos anémicos. [122] Num estudo feito em diabéticos anémicos sem doença renal, os níveis de Epo eram significativamente

menores quando comparados com os de anémicos não diabéticos, exceto em caso de doenças mieloproliferativas e anemias megaloblásticas. [123] Os potenciais mecanismos patológicos subjacentes aos níveis reduzidos de Epo em doentes com diabetes e/ou hipertensão incluem a perda de resposta hipóxica, possivelmente devido a alterações funcionais e/ou estruturais no túbulo proximal e no interstício cortical, ao efeito de produtos finais da glicação avançada ou a disfunção anatómica. [48]

Usando dados do *Baltimore Longitudinal Study of aging*, que incluiu 143 adultos seguidos durante pelo menos 8 anos, Ershler *et al* [122] fizeram uma análise longitudinal e verificaram um decréscimo modesto mas constante, dos níveis de Hb ao longo do tempo, apesar de a maioria dos participantes ter valores de Hb dentro do intervalo normal; apresentavam, ainda, um aumento modesto e constante nos níveis de Epo. Contudo, nos indivíduos com diabetes ou hipertensão, o aumento de Epo foi substancialmente menor comparativamente com os que não eram afetados por estas condições. Isto indica que o mecanismo compensatório da síntese de Epo é menos eficiente em doentes com diabetes *mellitus* ou hipertensão, uma vez que estas condições influenciam negativamente a função tubular renal, comprometendo a secreção de Epo. Estes dados sugerem que com o aumento da idade o mecanismo compensatório regulador da síntese de Epo torna-se inadequado. [122] Esta resposta inadequada pode ocorrer mesmo em doentes sem doença renal considerável, em doentes com doença renal intersticial oculta e uma TFG normal. [7]

Por outro lado, o envelhecimento pode ser acompanhado por uma resistência à ação da Epo, que desencadeará um aumento da produção de Epo, com a finalidade de manter a massa eritrocitária em níveis fisiológicos. Quando este ciclo de *feedback* é interrompido, especialmente naqueles com doença renal, diabetes ou hipertensão, a secreção de Epo diminui, levando a anemia. [48]

Embora a prevalência da anemia no homem idoso seja mais elevada do que na mulher idosa, tal não parece dever-se a diferenças no nível sérico de Epo. Foi também proposto que a diminuição das reservas de precursores eritroides no idoso pode contribuir para o desenvolvimento de anemia. Alterações nos níveis de citocinas associadas ao envelhecimento poderá ser outra causa de anemia no idoso. O aumento dos níveis séricos de IL-6 tem vindo a ser associado com anemia nos idosos e pode contribuir para o aumento da apoptose dos precursores eritroides. A anemia nos idosos é tipicamente normocítica e ligeira, com níveis de Hb que oscilam entre 10 g/dL e 12 g/dL na maioria (90%) dos indivíduos. [19]

Sabe-se que a terapia de substituição com Epo é eficaz no aumento dos níveis de Hb e melhora a qualidade de vida dos doentes em (pré) diálise, doentes com cancro e também em idosos da comunidade com anemia crónica inexplicada. [30] Contudo, ensaios clínicos recentes mostraram que o tratamento com agentes estimuladores da eritropoiese em

doentes com DRC ou cancro teve uma influência negativa na sobrevivência, o que claramente enfatiza a necessidade de mais estudos sobre a etiologia e os efeitos de altos níveis de Epo em indivíduos mais velhos. [124, 125]

No *Leiden 85-plus study* em idosos, foi observada uma associação positiva, entre os elevados níveis de Epo e o risco de mortalidade, independentemente da *clearance* de creatinina, níveis de Hb, comorbilidade, tabagismo e marcadores inflamatórios circulantes. [126]

Níveis elevados de Epo podem ocorrer em resposta a um estímulo hipóxico crónico devido a uma doença não diagnosticada. Mais frequentemente, os níveis de Epo elevados surgem como resposta fisiológica de compensação, em caso de hemólise ou de perda sanguínea. [48] Os níveis de Epo elevados também podem ser reflexo da resistência dos precursores eritroides da medula óssea à ação da Epo endógena causada por senescência ou por falência da medula óssea, comparável à resistência à insulina na diabetes *Mellitus* tipo 2. [42, 122] Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos e identificar as implicações clínicas e terapêuticas dos altos níveis de Epo na população idosa. [126]

Os efeitos pleiotrópicos da Epo nos tecidos não eritroides resultam da ligação da Epo aos seus EpoR nesses tecidos e, tal como em células eritroides, a interação Epo-EpoR inicia um processo de transdução de sinal, regulando a sobrevivência, o crescimento e a diferenciação dos tecidos envolvidos. A Epo e EpoR desempenham um papel fisiológico em muitas células não eritroides incluindo células endoteliais, megacariócitos, útero, mama e testículos, mas em alguns tecidos (ex. cérebro, coração e rim) o mecanismo de sinalização pode ser diferente. A Epo e EpoR possuem um papel benéfico no tecido neural, cardiovascular e retinal e nos sistemas imunes e de reparação tecidular. Outros efeitos como a melhoria da *performance* atlética e neurocognição têm sido atribuídos à sinalização Epo/EpoR, mas não estão devidamente fundamentados. Os efeitos prejudiciais da Epo incluem aumento da mortalidade por cancro, aumento da pressão arterial e tromboses. [62]

Embora o rim envelhecido tenha uma TFG diminuída, difere em vários aspetos do rim dos doentes com DRC, em qualquer idade. [96] (Tabela 6)

Tabela 6 - Semelhanças e diferenças a nível renal entre os idosos, com mais de 85 anos de idade, e os doentes com DRC em estadio 3. [adaptado de Musso CG *et al*, 2011] [96]

Semelhanças
• Baixa TFG (cerca de 50 ml/min/1,73 m^2); • Capacidade diminuída de reabsorção de sal e de água a nível tubular; • Excreção aumentada de ureia.
Diferenças
• A função do túbulo contornado proximal é preservada nos idosos saudáveis e os níveis de Epo e de Hb são normais. Inversamente, a anemia secundária a uma baixa secreção de Epo é uma das principais características da DRC; • O nível sérico de ureia é normal em idosos e está aumentado na nefropatia crónica; • Os níveis séricos e a excreção de cálcio, magnésio e fósforo são normais na população idosa saudável, enquanto que os indivíduos com DRC apresentam excreção aumentada destas substâncias, na presença de magnésio normal, baixo cálcio e elevado fósforo no soro; • Os níveis de PTH e de vitamina D ativa são normais em idosos saudáveis, enquanto a primeira está aumentada e a última diminuída na DRC; • A excreção de potássio aumenta à medida que a TFG diminui sob a influência da hormona aldosterona, em DRC. No entanto, a excreção de potássio está relativamente diminuída em relação à TFG nas pessoas idosas saudáveis. Este fenómeno tem sido atribuído aos níveis séricos relativamente baixos de aldosterona e à resistência à aldosterona em indivíduos idosos saudáveis; • A análise da urina é normal nos idosos saudáveis, o que significa que não apresentam nem hematúria nem proteinúria. No entanto, o nível de albuminúria pode depender do método de avaliação, uma vez que se utiliza a razão albumina/creatinina para avaliar a proteinúria, podendo-se obter um valor mais elevado devido à baixa excreção urinária de creatinina no idoso.

9. Alterações hematopoiéticas no idoso

9.1. "Envelhecimento" das células estaminais hematopoiéticas e alterações da sua expressão génica

As HSCs têm capacidade de autorrenovação, originando células do mesmo tipo ou mais diferenciadas e asseguram a homeostasia tecidular ao longo da vida. [127]

O sistema hematopoiético apresenta-se esquematicamente em forma de ramo. As HSCs sofrem proliferação e diferenciação, podendo originar células linfoides ou células mieloides. A série linfoide é composta principalmente por células que compõem o sistema imunitário adquirido, incluindo os linfócitos B e T, enquanto que a série mieloide está relacionada com a imunidade inata, estando envolvida na fagocitose e na resposta inflamatória e, ainda, na resposta hemostática e homeostase celular, uma vez que a HSC mieloide pode diferenciar-se para dar origem a granulócitos, monócitos, plaquetas e eritrócitos. [49]

As HSCs, por terem um papel fundamental na manutenção do sistema hematopoiético ao longo da vida, parecem estar protegidas dos efeitos que o envelhecimento provoca na diferenciação celular. Todavia, muitos estudos têm sugerido que as HSCs sofrem alterações drásticas na sua função e no seu fenótipo com o envelhecimento, nomeadamente, a nível da linha linfoide, diminuindo a sua função imune. [49] Atualmente há evidências de que as HSCs sofrem alterações qualitativas com a idade, de que resulta uma redução da sua capacidade proliferativa e regenerativa. [128]

As alterações no sistema hematopoiético associadas com o envelhecimento são demonstradas pelo aumento da incidência de doenças mieloides proliferativas, como o SMD, [129] e de cancro, devido a um declínio do sistema imune adaptativo. [130]

Nos idosos ocorre uma diminuição acentuada da produção de células linfoides e uma maior produção de células mieloides, determinando um ambiente pró-inflamatório. [127]

Estudos em HSCs, utilizando *microarrays*, têm revelado múltiplas alterações na expressão de genes com a idade. [131, 132] Os resultados indicam que estas modificações nas HSCs senescentes resultam de um grande número de alterações epigenéticas que afetam os sistemas biológicos na totalidade. Alterações na expressão de genes reguladores epigenéticos estão também envolvidas na desregulação epigenética, relacionada com o envelhecimento, que leva à expressão aberrante de genes, que podem causar transformação maligna e cancro. [131]

As HSCs têm o potencial de rejuvenescer muitos tecidos somáticos, mas podem ser incapazes de o fazer eficientemente, uma vez que elas, por si só, estão sujeitas ao envelhecimento. [127]

Quer o sistema imunitário inato, quer o adquirido, operam em conjunto para combater os agentes patogénicos, ao longo da vida. As alterações no sistema imune, relacionadas com a idade, ou alterações por imunosenescência, determinam maior sensibilidade a agentes patogénicos, devido a uma resposta antigénica atenuada e a proliferação limitada de linfócitos. [133] Uma explicação simples para a imunossenescência pode ser a exaustão das HSCs, semelhante ao que é visto na anemia aplástica. [134] No entanto, é improvável que se trate desta situação uma vez que se observa concomitantemente uma mielopoiese acentuada. [49]

Em todos os tecidos regenerativos há uma propensão aumentada para cancro, com o avançar da idade. Uma hematopoiese desequilibrada, marcada por mielopoiese acentuada, um aumento do número e da homogeneidade das HSCs da medula óssea, e uma diminuição geral na produção de células são frequentemente observadas em idosos. [129]

Poderia esperar-se que as HSCs fossem uma fonte de juventude, mas Chambers *et al* [49] mostraram que as HSCs envelhecem, com taxas e características semelhantes a qualquer outro tipo de células somáticas. Assim, estimular simplesmente as HSCs existentes não é uma solução para reforçar o sistema hematopoiético. Estes autores pensam que provavelmente o microambiente não é inteiramente responsável pelo envelhecimento das HSCs, uma vez que quando as HSCs envelhecidas são cultivadas em ambiente jovem, a sua resposta inflamatória diminui, mas as outras alterações associadas ao envelhecimento, como a perda de regulação epigenética, não retomam o seu estado juvenil.

A fim de investigar os mecanismos moleculares responsáveis pelo declínio na função individual das HSCs com a idade, foi estudado o perfil genómico de expressão das HSCs purificadas de ratinhos jovens e velhos, por dois grupos diferentes. [131, 132] Estes dois estudos utilizaram diferentes estratégias para a purificação das HSCs e encontraram diferentes conjuntos de genes com expressão alterada ao longo do tempo.

Rossi *et al* [132] verificaram que 907 genes sofrem alterações na sua regulação, com a idade. Verificaram também que a expressão dos genes envolvidos na diferenciação linfoide estava diminuída, enquanto que a expressão dos genes relacionados com a linha mieloide estava aumentada, o que está de acordo com o aumento de células mieloides que se observa durante o envelhecimento. Foi observado um aumento da expressão de muitos proto-oncogenes, com o envelhecimento, que estão envolvidos nas leucemias mieloides.

Chambers *et al* [131] verificaram que a expressão dos genes relacionados com a resposta ao *stress* e dos genes pró-inflamatórios estava aumentada com a idade, enquanto que a expressão dos genes de remodelação da cromatina e de reparação do DNA estava

diminuída, o que favorece o aumento da instabilidade genómica e alterações no epigenoma.

Um dos genes mais expresso pelas HSCs envelhecidas é um membro da família das seletinas, a P seletina (SelP ou CD62P), que codifica para uma proteína de adesão celular. As seletinas ligam-se a um ligando de hidrato de carbono [135]. As três seletinas têm expressão distinta e específica em leucócitos (SelL), plaquetas (SelP) e no endotélio vascular (SelE). [136] A expressão da SelP é mais comum nas plaquetas ativadas e células endoteliais quando a resposta inflamatória está exacerbada. A expressão da SelP nas HSCs envelhecidas é consistente com a exposição destas a um ambiente altamente inflamatório, uma vez que a SelP tem um papel importante na resposta inflamatória. [136, 137]

A expressão da SelP é regulada transcripcionalmente pelo *Nuclear Factor kappa* B (NFkB), em resposta a citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-α e várias interleucinas; [137] estes achados são também consistentes com um microambiente inflamatório, já que o NFkB é reconhecido como um importante mediador da inflamação, e têm sido descritos níveis elevados de NFkB ativado no núcleo de HSCs envelhecidas. [131]

Considerando que a SelP está envolvida na adesão célula-célula e que as interações entre as HSCs e o nicho desempenham um papel importante na função das HSCs, o aumento da expressão da SelP pode afetar a função das HSCs; no entanto, mais estudos têm de ser realizados para melhor esclarecer esta interação. Também não é claro se a expressão da SelP está diminuída quando as HSCs se diferenciam, ou se o nível de expressão elevado é transmitido à sua descendência. [49]

Estes dados demonstram claramente que as HSCs não estão protegidas contra alterações associadas com o envelhecimento.

9.2. Alteração nos níveis de eritropoietina

A Epo regula a proliferação das células eritroides e a sua expressão está inversamente relacionada com a oxigenação tecidular e com a concentração de Hb.[24]

As citocinas Il-1 e TNF-α inibem diretamente a expressão de Epo *in vitro* – um resultado que é provavelmente devido, em parte, à formação de ROS (espécies reativas de oxigénio) mediada por citocinas, o que por sua vez afeta a afinidade de ligação dos fatores de transcrição indutíveis de Epo e também danifica as células produtoras de Epo. Embora haja escassez de dados, a injeção de LPS em ratos resulta na expressão reduzida de mRNA Epo nos rins e decréscimo dos níveis circulantes de Epo. [24] A capacidade de resposta das células progenitoras eritroides à Epo parece estar inversamente relacionada com a severidade da doença crónica subjacente e com a quantidade de citocinas circulantes, já

que na presença de altas concentrações de interferon-γ ou TNF-α são necessárias quantidades muito maiores de Epo para repor a formação das unidades formadoras de colónias eritroides. [138] Depois da ligação aos seus recetores, a Epo estimula membros de vias de transdução de sinal e subsequentemente ativa o mitogénio e a fosforilação da cinase de tirosina, processo que é afetado pelas citocinas inflamatórias e pela regulação de *feedback* negativo que elas induzem. [139]

9.3. Associação com estados pró-inflamatórios

Enquanto o sistema imune adquirido sofre uma redução, com o envelhecimento, um efeito oposto é observado no sistema imune inato (linha mieloide). Em resposta a *stress* ambiental sub-crónico (antigénico, oxidativo, etc.) a resposta inflamatória conseguida por células mieloides torna-se mais pronunciada, levando a um ambiente pró-inflamatório excessivo, descrito como "inflamaging". [140] Ambos os conceitos, "inflamaging" e imunoenvelhecimento revelam que o envelhecimento do sistema imune é um mecanismo complexo, que envolve todas as células que fazem parte do sistema sanguíneo, especialmente as HSCs, dado que estas são a base deste sistema. [127]

O envelhecimento e o aparecimento de comorbilidades relacionadas com a idade têm sido associados com o aumento crónico dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF-α, IL-6, IL-1β, MIF e proteínas de fase aguda. [141] O MIF é uma citocina com propriedades de ativação imune que é segregada pelos macrófagos e pelos linfócitos T, e aumenta em doenças inflamatórias. Esta atua nos macrófagos de modo a induzir a libertação de muitos mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6, e serve como um regulador do TNF-α. Além disso, tem-se mostrado que o MIF e o TNF-α comprometem a formação de colónias eritroides, e que o MIF está implicado na patogénese da anemia associada à malária. [142] O aumento da inflamação nos idosos é relativamente ligeiro, isto é, um aumento crónico de baixo nível nos mediadores inflamatórios, em oposição ao estado dramaticamente elevado de mediadores inflamatórios que pode ser visto na doença aguda ou em doenças autoimunes. O aumento dos marcadores inflamatórios observado nos idosos pode ser devido, pelo menos em parte, à resposta à presença de comorbilidades, e não só ao próprio processo de envelhecimento. [141] Alguns estudos têm sugerido que os níveis circulantes de citocinas inflamatórias não são elevados em idosos saudáveis, enquanto outros têm sugerido que estes marcadores são elevados, mesmo na ausência de comorbilidades. No estudo InCHIANTI os níveis de IL-6, IL-1, recetor antagonista, IL-18, PCR e fibrinogénio estavam elevados nos doentes com idade superior a 65 anos, embora quando, ajustados para os fatores de risco cardiovascular e comorbilidade, o aumento fosse substancialmente menor. [141]

É sabido que a inflamação afeta a eritropoiese, o que é particularmente evidente na AIC. Esta anemia é normocítica, normocrómica, com diminuição da sobrevivência dos eritrócitos, níveis reduzidos de Epo, e uma resposta inadequada à Epo. [143]

Como já foi referido, a hepcidina é um regulador negativo da absorção de ferro, levando a hipoferrinemia. Os mediadores inflamatórios, particularmente a IL-6 e IL-1, determinam um aumento da síntese hepática de hepcidina, que, por sua vez, reduz a absorção intestinal de ferro e a libertação de ferro pelos macrófagos para os progenitores e precursores eritroides, comprometendo, desta forma, a eritropoiese. [31]

Em doentes com AIC a proliferação e a diferenciação dos precursores eritroides estão comprometidas, devido aos efeitos inibitórios dos marcadores inflamatórios, os quais influenciam o crescimento das unidades formadoras de colónias eritroides. Os mecanismos subjacentes podem envolver a indução de apoptose mediada pelas citocinas que parece, em parte, relacionada com a formação de ceramida, a regulação negativa da expressão de recetores de Epo nas células progenitoras, comprometimento da formação e da atividade da Epo e uma redução da expressão de outros fatores hematopoieticos, como o *stem cell factor*. [24] Além disso, as citocinas exercem efeitos tóxicos diretos nas células progenitoras pela indução da formação de radicais livres, como o óxido nítrico ou o anião superóxido, pelos macrófagos. [144]

9.4. Outras

A eritropoiese pode ser afetada pelo facto de os idosos apresentarem frequentemente comorbilidades (perdas sanguíneas gastrointestinais crónicas, hemorroidas, úlceras, entre outras situações), que podem levar à diminuição de nutrientes eritropoiéticos o que se traduz numa diminuição da eritropoiese, levando a anemia. Para além disto, a presença de comorbilidades pode também incapacitá-los de fazerem uma alimentação completa, rica em nutrientes e vitaminas. Esta alimentação inadequada pode levar a anorexia, com subsequente carência de nutrientes eritropoiéticos, diminuição da eritropoiese e anemia. Devido à presença de comorbilidades, os idosos, frequentemente, apresentam-se psicologicamente frágeis e debilitados, o que pode determinar uma rotina alimentar diária inadequada, podendo desta forma afetar a eritropoiese.

10. Insuficiência renal crónica no idoso: fisiológica, patológica ou ambas?

Ainda que envelhecer não seja sinónimo de doença, permanece um pouco incerto se o declínio na função renal, com a idade, está associado com o envelhecimento vascular biológico ou com a idade cronológica, por si só. É provável que a exposição cumulativa a fatores de riscos cardiovasculares e renais em indivíduos com predisposição genética resulte no que parece ser um declínio da função renal relacionado com a idade. Provavelmente a combinação de alterações vasculares relacionadas com a idade proporciona o substrato adequado aos fatores de risco cardiovasculares tradicionais para promover DCV e subsequentemente DRC. (90)

Tem sido proposto que os indivíduos predispostos geneticamente, ou aqueles cujo risco emerge durante o período fetal ou pós-natal, desenvolvam DCV quando expostos ao longo da vida a fatores de risco cardiovasculares, tais como hipertensão, diabetes, tabagismo e/ou dislipidemias. A DCV com lesões renais arterial, arteriolar e capilar (glomerular) associadas, leva a isquemia renal e a uma progressiva diminuição da função renal. (90) A taxa de declínio da função renal nestes indivíduos pode ser acelerada por outras situações que se desenvolvem mais tarde na vida, como episódios de lesão renal aguda (145), nefrotoxicidade devida a drogas ou obstrução do trato urinário. Para além destas situações, o declínio pode também estar associado com o mau controlo da hipertensão ou da diabetes. (90)

Os idosos com função renal normal podem ter uma herança genética que não os predispõem ao envelhecimento vascular biológico e/ou têm uma exposição mínima a fatores de risco cardiovasculares. Os indivíduos idosos com função renal comprometida mas estável (TFG <60 mL/min/1,73m^2) têm probabilidade de terem sofrido o efeito cumulativo da exposição a fatores de risco cardiovasculares durante a vida com a subsequente isquemia e disfunção renal. Na ausência de doenças renais intrínsecas adicionais, proteinúria ou dano renal contínuo, esses indivíduos raramente progridem para ESRD. Pelo contrário, os idosos com DRC progressiva e com evidente proteinúria associada podem ter, quer uma forma mais severa e progressiva de patologia renal vascular, com aterosclerose e glomerosclerose marcada, quer uma doença renal intrínseca progressiva, tal como glomerulonefrite crónica. É provável que estes últimos progridam para ESRD quando expostos a danos renais sobrepostos e intercorrentes como lesão, nefrotoxicidade de fármacos, uropatia obstrutiva ou hipertensão. (90)

Em conclusão, a função renal comprometida nos idosos resulta frequentemente de uma combinação de alterações fisiológicas e patológicas. Os indivíduos com maiores alterações renais apresentam danos vasculares graves que afetam vários órgãos, incluindo os rins. A

presença de microalbuminúria é uma manifestação frequente de dano vascular sistémico. Por outro lado, a proteinúria evidente reflete doença renal severa e progressiva. (90)

Conclusão

O envelhecimento envolve alterações fisiológicas comuns a todos os indivíduos, que os tornam mais vulneráveis a diversas patologias. A anemia é uma das patologias mais prevalente na população idosa e que tem como principais causas alterações renais e na medula óssea e estados pró- inflamatórios. A presença de comorbilidades associadas a alterações inerentes ao processo de envelhecimento potenciam o desenvolvimento de anemia.

O envelhecimento está associado com alterações estruturais e funcionais a nível renal, com diminuição da TFG e da produção de Epo, sendo esta uma causa frequente de anemia no idoso. Estas alterações tornam os idosos mais suscetíveis a DRC. De facto, a DRC apresenta uma elevada prevalência na população idosa, no entanto, não se pode considerar que esta doença resulta apenas das alterações fisiológicas vasculares e renais do "envelhecimento natural", ou seja, nem todos os idosos apresentarão DRC apenas pelo facto de terem envelhecido. As alterações fisiológicas em associação com alterações patológicas (diabetes *Mellitus*, hipertensão, perturbações de ordem glomerular e túbulo-intersticial, DCV) e/ou exposição a fatores de risco (tabagismo, nefrotoxinas, obesidade, dislipidemia) poderão potenciar o desenvolvimento de DRC.

Relativamente às alterações a nível da medula óssea, tem sido descrito que a capacidade proliferativa e regenerativa das HSCs diminui com o envelhecimento. A função imunológica sofre também alterações ao longo da vida, nomeadamente uma diminuição da linha linfoide e produção exacerbada de células mieloides, o que provoca um ambiente pró-inflamatório e aumenta a incidência de doenças mieloproliferativas. O envelhecimento também pode ocasionar alterações na expressão de genes reguladores epigenéticos, o que leva a desregulação epigenética, originando uma expressão aberrante de alguns genes, que podem levar a transformação maligna e doenças cancerosas.

Os idosos são afetados por um estado pró-inflamatório crónico e ligeiro caracterizado por níveis ligeiramente aumentados de marcadores pró-inflamatórios. Este estado pode induzir um aumento de hepcidina e, consequentemente, promover o desenvolvimento de anemia, uma vez que a hepcidina é um regulador negativo do metabolismo do ferro e este é um nutriente essencial para a eritropoiese. Também tem sido proposto que as citocinas pró-inflamatórias têm a capacidade de inibir a eritropoiese através do aumento da apoptose dos progenitores eritroides, bem como por inibirem diretamente a diferenciação e proliferação de células progenitoras eritroides. A Epo, quando em concentração adequada pode atuar como um fator antiapoptótico, essencial na eritropoiese. Porém, na presença de uma elevada concentração de citocinas pró-inflamatórias, a produção de Epo pode ser inadequada e a eritropoiese comprometida.

Embora a prevalência da anemia seja alta em idosos, não deve ser entendida como uma consequência inevitável do envelhecimento. A causa subjacente à anemia deve ser identificada e tratada eficazmente de modo que a velhice seja vivida o mais dignamente possível. Dado que as alterações fisiológicas inerentes ao processo de envelhecimento são inevitáveis deve-se atuar ao nível das patologias que vão surgindo, a fim de controlar e minimizar os efeitos graves que estas, em combinação com as alterações fisiológicas, podem originar.

Este trabalho foi extremamente útil para aumentar o meu conhecimento científico no que diz respeito às alterações hematológicas decorrentes do envelhecimento e permitiu-me perceber que a anemia na população idosa resulta da combinação de alterações fisiológicas e patológicas.

Bibliografia

1. Barbosa DL, Arruda IKG, Diniz AS. Prevalência e caracterização da anemia em idosos do Programa de Saúde da Família. Rev bras hematol hemoter 2006; 28 (4): 288-92.

2. Beghé C, Wilson A, Ershler WB. Prevalence and outcomes of anemia in geriatrics: a systematic review of the literature. Am J Med 2004 Apr; 116 (Suppl 7A): S3-10.

3. Balducci L. Epidemiology of anemia in the elderly: information on diagnostic evaluation. J Am Geriatr Soc 2003 Mar; 51 (Suppl 3): S2-9.

4. WHO (World health Organization). Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneve 2001.

5. Patel KV. Epidemiology of Anemia in Older Adults. Semin Hematol 2008 Oct; 45 (4): 201-17.

6. Nandigam V, Nandigam K, Badhe BA, Dutta TK. Is adult definition of anemia applicable to a geriatric population? Study of erythrocyte parameters in Indian geriatric inpatients. J Am Geriatr Soc 2004 Sep; 52 (9): 1589-90.

7. Culleton BF, Manns BJ, Zhang J, Tonelli M, Klarenbach S, Hemmelgarn BR. Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults. Blood 2006 May; 107 (10): 3841-6.

8. Zakai NA, Katz R, Hirsch C, Shlipak MG, Chaves PH, Newman AB, et al. A prospective study of anemia status, hemoglobin concentration, and mortality in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study. Arch Intern Med 2005 Oct; 165 (19): 2214-20.

9. Makipour S, Kanapuru B, Ershler WB. Unexplained anemia in the elderly. Semin Hematol 2008 Oct; 45 (4): 250-4.

10. Patel KV, Guralnik JM. Prognostic implications of anemia in older adults. Haematologica 2009 Jan; 94 (1): 1-2.

11. Lipschitz D. Medical and functional consequences of anemia in the elderly. J Am Geriatr Soc 2003 Mar; 51 (Suppl 3): S10-3.

12. Spivak JL. Anemia in the elderly. Time for new blood in old vessels?. Arch Intern Med 2005 Oct; 165 (19): 2187-9.

13. Guralnik J, Eisenstaedt R, Ferrucci L, Klein H, Woodman R. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. Blood 2004 Oct; 104 (8): 2263-8.

14. Izaks GJ, Westendorp RG, Knook DL. The definition of anemia in older persons. JAMA 1999 May; 281 (18): 1714-7.

15. Denny SD, Kuchibhatla MN, Cohen HJ. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. Am J Med 2006 Apr; 119 (4): 327-34.

16. Penninx BW, Pahor M, Woodman RC, Guralnik JM. Anemia in old age is associated with increased mortality and hospitalization. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2006 May; 61 (5): 474-9.

17. Skjelbakken T, Langbakk B, Dahl IM, Lochen ML. Haemoglobin and anaemia in a gender perspective: the Tromso Study. Eur J Haematol 2005 May; 74 (5): 381-8.

18. Chaves PH, Xue QL, Guralnik JM, Ferrucci L, Volpato S, Fried LP. What constitutes normal hemoglobin concentration in community-dwelling disabled older women?. J Am Geriatr Soc 2004 Nov; 52 (11): 1811-6.

19. Eisenstaedt R, Penninx BW, Woodman RC. Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. Blood Rev 2006 Jul; 20 (4): 213-26.

20. Artz AS, Fergusson D, Drinka PJ, Gerald M, Gravenstein S, Lechich A, et al. Prevalence of anemia in skilled-nursing home residents. Arch Gerontol Geriatr 2004 Nov-Dec; 39 (3): 201-6.

21. Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003: 62-81.

22. Vanasse GJ, Berliner N. Anemia in Elderly: An emerging problema for the 21st century. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2010; 2010 (1): 271-5.

23. Spivak JL. The anaemia of cancer: death by a thousand cuts. Nat Rev Cancer 2005 Jul; 5 (7): 543-55.

24. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. N Engl J Med 2005 Mar; 352 (10): 1011-23.

25. Keller CR, Odden MC, Fried LF, Newman AB, Angleman S, Green CA, et al. Kidney function and markers of inflammation in elderly persons without chronic kidney disease: the health, aging, and body composition study. Kidney Int 2007 Feb; 71 (3): 239-44.

26. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 2001 Mar; 276 (11): 7806-10.

27. Krause A, Neitz S, Magert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 2000 Sep; 480 (2-3): 147-50.

28. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood 2003 Aug; 102 (3): 783-8.

29. Weinstein DA, Roy CN, Fleming M, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. Blood 2002 Nov; 100 (10): 3776-81.

30. Elzen WPJ, Gussekloo J. Anaemia in older persons. Neth J Med 2011 Jun; 69 (6): 260-7.

31. Ganz T. Hepcidin-a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. Best Pract Res Clin Haematol 2005 Jun; 18 (2): 171-82.

32. Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. Proc Natl Acad Sci USA 2002 Apr; 99 (7): 4596-601.

33. Roy CN, Mak HH, Akpan I, Losyev G, Zurakowski D, Andrews NC. Hepcidin antimicrobial peptide transgenic mice exhibit features of the anemia of inflammation. Blood 2007 May; 109 (9): 4038-44.

34. Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. J Clin Invest 2002 Oct; 110 (7): 1037-44.

35. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Kelle C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. J Clin Invest 2004 May; 113 (9): 1271-6.

36. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J, et al. Hepcidin in iron overload disorders. Blood 2005 May; 105 (10): 4103-5.

37. Ferrucci L, Semba RD, Guralnik JM, Ershler WB, Bandinelli S, Patel KV, et al. Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. Blood 2010 May; 115 (18): 3810-6.

38. Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. Blood 2003 Apr; 101 (7): 2461-3.

39. Kawabata H, Tomosugi N, Kanda J, Tanaka Y, Yoshizaki K, Uchiyama T. Anti-interleukin 6 receptor antibody tocilizumab reduces the level of serum hepcidin in patients with multicentric Castleman's disease. Haematologica 2007 Jun; 92 (6): 857- 8.

40. Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydınok Y, Pearson HA, Hartman KR, et al. Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). Nat Genet 2008 May; 40 (5): 569-71.

41. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. Blood 2005 Sep; 106 (5): 1864-6.

42. Ferrucci L, Guralnik JM, Woodman RC, Bandinelli S, Lauretani F, Corsi AM, et al. Proinflammatory state and circulating erythropoietin in persons with and without anemia. Am J Med 2005 Nov; 118 (11): 1288-96.

43. Ble A, Fink JC, Woodman RC, Klausner MA, Windham BG, Guralnik JM, et al. Renal function, erythropoietin, and anemia of older persons. Arch Intern Med 2005 Oct; 165 (19): 2222- 7.

44. Cumming RG, Mitchell P, Craig JC, Knight JF. Renal impairment and anaemia in a population-based study of older people. Intern Med J 2004 Jan-Feb; 34 (1-2): 20-3.

45. Greenberg PL, Young NS, Gattermann N. Myelodysplastic syndromes. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002: 136-61.

46. Nishino HT, Chang CC. Myelodysplastic syndromes: Clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. Arch Pathol Lab Med 2005 Oct; 129 (10): 1299-310.

47. Roy CN. Anemia in frailty. Clin Geriatr Med 2011 Feb; 27 (1): 67-8.

48. Price EA. Aging and erythropoiesis: current state of knowledge. Blood Cells Mol Dis 2008 Sep-Oct; 41 (2): 158-65.

49. Chambers SM, Goodell MA. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. Stem cell rev 2007; 3 (3): 201-11.

50. Balducci L, Hardy CL. Anemia of aging: a model of erythropoiesis in cancer patients. Cancer Control 1998 Mar; 5 (Suppl 1): 17-21.

51. Balducci L. Anemia, cancer, and aging. Cancer Control 2003 Nov-Dec; 10 (6): 478-86.

52. Artz AS, Fergusson D, Drinka PJ, Gerald M, Bidenbender R, Lechich A, et al. Mechanisms of unexplained anemia in the nursing home. J Am Geriatr Soc 2004 Mar; 52 (3): 423-7.

53. Ferrucci L, Guralnik JM, Bandinelli S, Semba RD, Lauretani F, Corsi A, et al. Unexplained anaemia in older persons is characterised by low erythropoietin and low levels of pro-inflammatory markers. Br J Haematol 2007 Mar; 136 (6): 849-55.

54. Agnihotri P, Telfer M, Butt Z, Jella A, Cella D, Kozma CM, et al. Chronic anemia and fatigue in elderly patients: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover exploratory study with epoetin alfa. J Am Geriatr Soc 2007 Oct; 55 (10): 1557-65.

55. Ferrucci L, Guralnik JM, Bandinelli S, Semba RD, Lauretani F, Corsi A, et al. Unexplained anaemia in older persons is characterized by low erythropoietin and low levels of pro-inflammatory markers. Br J Haematol 2007 Mar; 136 (6): 849-55.

56. Sun WH, Keller ET, Stebler BS, Ershler WB. Estrogen inhibits phorbol ester-induced I kappa B alpha transcription and protein degradation. Biochem Biophys Res Commun 1998 Mar; 244 (3): 691-5.

57. Keller ET, Chang C, Ershler WB. Inhibition of NFkappaB activity through maintenance of IkappaBalpha levels contributes to dihydrotestosterone-mediated repression of the interleukin-6 promoter. J Biol Chem 1996 Oct; 271 (42): 26267-75.

58. Ershler WB. Biological interactions of aging and anemia: a focus on cytokines. J Am Geriatr Soc 2003 Mar; 51 (Suppl 3): S18-21.

59. Giuliani N, Sansoni P, Girasole G, Vescovini R, Passeri G, Passeri M, et al. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. Exp Gerontol 2001 Mar; 36 (3): 547-57.

60. George J, Patal S, Wexler D, Abashidze A, Shmilovich H, Barak T, et al. Circulating erythropoietin levels and prognosis in patients with congestive heart failure: comparison with neurohormonal and inflammatory markers. Arch Intern Med 2005 Jun; 165 (11): 1304-9.

61. Avkarogullari M, Bozkurt A, Akpinar O, Dönmez Y, Demirtas M. The relation between serum erythropoietin level and severity of disease and mortality in patients with chronic heart failure. Acta Cardiol 2008 Jun; 63 (3): 297-302.

62. Agarwal N, Prchal JT. Erithropoietic agentes and the elderly. Semin Hematol 2008 Oct; 45 (4): 267-75.

63. Higgs DR, Wood WG. Erythropoiesis. In: Hoffbrand AV, Catovsky D, Tuddenham EGD, editors. Postgraduate Haematology. 5th ed: Blachwell Publishing; 2005. p. 13-25.

64. Lash AA, Coyer SM. Anemia in older adults. Medsurg Nurs 2008 Oct; 17 (5): 298-304.

65. Metz J. A high prevalence of biochemical evidence of vitamin B12 or folate deficiency does not translate into a comparable prevalence of anemia. Food Nutr Bull 2008 Jun; 29 (Suppl 2): S74-85.

66. Patel KV, Harris TB, Faulhaber M, Angleman SB, Connelly J, Bauer DC, et al. Racial variation in the relationship of anemia with mortality and mobility disability among older adults. Blood 2007 Jun; 109 (11): 4663-70.

67. Wu WC, Rathore SS, Wang Y, Radford MJ, Krumholz HM. Blood transfusion in elderly patients with acute myocardial infarction. N Engl J Med 2001 Oct; 345 (17): 1230-6.

68. Sharma R, Francis DP, Pitt B, Poole-Wilson PA, Coats AJ, Anker SD. Haemoglobin predicts survival in patients with chronic heart failure: a substudy of the ELITE II trial. Eur Heart J 2004 Jun; 25 (12): 1021-8.

69. Nair D, Shlipak MG, Angeja B, Liu HH, Schiller NB, Whooley MA. Association of anemia with diastolic dysfunction among patients with coronary artery disease in the Heart and Soul Study. Am J Cardiol 2005 Feb; 95 (3): 332-6.

70. Amin MG, Tighiouart H, Weiner DE, Stark PC, Griffith JL, MacLeod B, et al. Hematocrit and left ventricular mass: the Framingham Heart study. J Am Coll Cardiol 2004 Apr; 43 (7): 1276-82.

71. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Leibovitch E, et al. The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and

functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. J Am Coll Cardiol 2000 Jun; 35 (7): 1737-44.

72. Metivier F, Marchais SJ, Guerin AP, Pannier B, London GM. Pathophysiology of anemia: Focus on the heart and blood vessels. Nephrol Dial Transplant 2000; 15 (Suppl 3): 14-8.

73. Guse CE, Porinsky R. Risk factors associated with hospitalization for unintentional falls: Wisconsin hospital discharge data for patients aged 65 and over. WMJ 2003; 102 (4): 37-42.

74. Argyriadou S, Vlachonikolis I, Melisopoulou H, Katachanakis C, Lionis C. In what extent anemia coexists with cognitive impairment in elderly: a cross-sectional study in Greece. BMC Fam Pract 2001 Oct; 2 (5).

75. Nissenson AR. Epoetin and cognitive function. Am J Kidney Dis 1992 Jul; 20 (Suppl 1): 21-4.

76. Kolnaar BGM, Van Wijk MAM, Pijnenborg L, Assendelft WJJ. Summary of the Dutch College of General Practitioners' practice guideline 'anemia'. Ned Tijdschr Geneeskd 2003 Oct; 147 (40): 1956-61.

77. Allen LH. Causes of vitamin B12 and folate deficiency. Food Nutr Bull 2008 Jun; 29 (Suppl 2): S5-7.

78. Bross MH, Soch K, Smith-Knuppel T. Anemia in Older Persons. Am Fam Physician 2010 Sep; 82 (5): 480-7.

79. Mukhopadhyay D, Mohanaruban K. Iron deficiency anaemia in older people: investigation, management and treatment. Age Ageing 2002 Mar; 31 (2): 87-91.

80. Hoffbrand AV, Moss PAH. Essencial Haematology. 6th ed.: Wiley-Blackwell; 2011.

81. Killip S, Bennett JM, Chambers MD. Iron deficiency anemia. Am Fam Physician 2007 Mar; 75 (5): 671-8.

82. Rimon E, Kagansky N, Kagansky M, Mechnick L, Mashiah T, Namir M, et al. Are we giving too much iron? Low-dose iron therapy is effective in octogenarians. Am J Med 2005 Oct; 118 (10): 1142-7.

83. Andrès E, Dali-Youcef N, Vogel T, Serraj K, Zimmer J. Oral cobalamin (vitamin B(12)) treatment. An update. Int J Lab Hematol 2009 Feb; 31 (1): 1-8.

84. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. N Engl J Med 2006 Nov; 355 (20): 2085-98.

85. Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, Cooper ME, Zeeuw D, Eckardt KU, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease. N Engl J Med 2009 Nov; 361 (21): 2019-32.

86. Wright JR, Ung YC, Julian JA, Pritchard KI, Whelan TJ, Smith C, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. J Clin Oncol 2007 Mar; 25 (9): 1027-32.

87. Agentes estimuladores da eritropoiese. Disponível em http://www.infarmed.pt/infomed/pesquisa.php [acedido em 3/9/2012]

88. European Medicines Agency. Disponível em http://www.ema.europa.eu/ema/ [acedido em 3/9/2012]

89. Kusumota L, Rodrigues RAP, Marques S. Idosos com Insuficiência Renal Crônica: Alterações do estado de saúde. Rev Latino Am Enfermagem 2004 May-Jun; 12 (3): 525-32.

90. Abdelhafiz AH, Brown SHM, Bello A, El Nahas M. Chronic Kidney Disease in Older People: Physiology, Pathology or Both?. Nephron Clin Pract 2010 May; 116 (1): c19-24.

91. Winearls CG, Glassock RJ. Dissecting and refining the staging of chronic kidney disease. Kidney Int 2009 May; 75 (10): 1009-14.

92. Abreu PF, Sesso RCC, Ramos LR. Aspetos renais no idoso. J Bras Nefrol 1998; 20 (2): 158-65.

93. Ferrucci L, Maggio M, Bandinelli S, Basaria S, Lauretani F, Ble A, et al. Low testosterone levels and the risk of anemia in older men and women. Arch Intern Med 2006 Jul; 166 (13): 1380-8.

94. Christ ER, Cummings MH, Westwood NB, Sawyer BM, Pearson TC, Sonksen PH, et al. The importance of growth hormone in the regulation of erythropoiesis, red cell mass, and plasma volume in adults with growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1997 Sep; 82 (9): 2985-90.

95. Seeley RR, Stephens TD, Tate P. Anatomia & Fisiologia. 6ª ed: Lusociência; 2005. p. 959-80.

96. Musso CG, Oreopoulos DG. Aging and physiological changes of the kidneys including changes in glomerular filtration rate. Nephron Physiology 2011 Aug; 119 (Suppl 1): 1-5.

97. Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. The aging kidney. Kidney Int 2008 Sep; 74 (6): 710-20.

98. Rule AD, Amer H, Cornell LD, Taler SJ, Cosio FG, Kremers WK, et al. The association between age and nephrosclerosis on renal biopsy among healthy adults. Ann Intern Med 2010 May; 152 (9): 561-7.

99. Bleyer AJ, Shemanski LR, Burke GL, Hansen KJ, Appel RG. Tobacco, hypertension, and vascular disease: risk factors for renal functional decline in an older population. Kidney Int 2000 May; 57 (5): 2072-9.

100. Fliser D, Zeier M, Nowack R, Ritz E. Renal functional reserve in healthy elderly subjects. J Am Soc Nephrol 1993 Jan; 3 (7): 1371-7.

101. Ahmed AK, Brown SHM, Abdelhafiz AH. Chronic Kidney Disease in Older People; Disease or Dilemma?. Saudi J Kidney Dis Transpl 2010 Sep; 21 (5): 835-41.

102. Fluck R. Controversies in chronic kidney disease, anaemia and cardiovascular disease. British Journal of Hospital Medicine 2008 Oct; 69 (10): 580-6.

103. Jungers P, Chauveau P, Descamps-Latscha B, Labrunie M, Giraud E, Man NK, et al. Age and gender-related incidence of chronic renal failure in a French urban area: a prospective epidemiologic study. Nephrol Dial Transplant 1996 Aug; 11 (8): 1542-6.

104. Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ. Forecast of the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2010. J Am Soc Nephrol 2001 Dec; 12 (12): 2753-8.

105. Krishanan M, Lok CE, Jassal SV. Epidemiology and demographic aspects of treated end-stage renal disease in the elderly. Semin Dial 2002 Mar-Apr; 15 (2): 79-83.

106. Hemmelgarn BR, Zhang J, Manns BJ, Tonelli M, Larsen E, Ghali WA, et al. Progression of kidney dysfunction in the community-dwelling elderly. Kidney Int 2006 Jun; 69 (12): 2155-61.

107. Silva FG. The aging kidney: a review-part I. Int Urol Nephrol 2005; 37 (1): 185-205

108. Silva FG. The aging kidney: a review-part II. Int Urol Nephrol 2005; 37 (2): 412-32.

109. Tonelli M, Jose P, Curhan G, Sacks F, Braunwald E, Pfeffer M, et al. Proteinuria, impaired kidney function, and adverse outcome in pelople with coronary disease: analysis of a previously conducted randomized trial. BMJ 2006 Jun; 332: 1426-31.

110. Hallan SI, Dahl K, Oien CM, Grootendorst DC, Aasberg A, Holmen J, et al. Screening strategies for chronic kidney disease in general population: follow-up of cross sectional health survey. BMJ 2006 Nov; 333: 1047-53.

111. Kronenberg F. Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression. Nat Rev Nephrol 2009 Dec; 5 (12): 677- 89.

112. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, Hersberger M, Kronenberg F, von Eckardstein A. Serum Creatinine, Cystatin C, and beta-trace Protein in Diagnostic Staging and Predicting Progression of Primary Nondiabetic Chronic Kidney Disease. Clin Chem 2010 May; 56 (5): 5740-9.

113. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease Am J Kidney Dis 2002; 39 (Suppl 1): S1-266.

114. Gracía S, Montañes R, Bover J, Cases A, Deulofeu R, Martín de Francisco AL, et al. Documento de consenso: Recomendaciones sobre la utilización de ecuaciones para la estimación del filtrado glomerular en adultos. Nefrología 2006; 26 (6): 658-65.

115. Rosa-Diez GJ, Varela F, Crucelegui S, Algranati SL, Greloni G. Comparacion entre las ecuaciones CKD-EPI y MDRD para la estimacion del filtrado glomerular en pacientes com enfermedad renal crónica. Medicina (B Aires) 2011 Aug; 71 (4): 323-30.

116. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. JAMA 2007 Nov; 298 (17): 2038-47.

117. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. Nefrología 2010; 30 (1): 78-86.

118. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med 2009 May; 150 (9): 604-12.

119. Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, Emberson JR, Jafar TH, Jee SH, et al. Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate. JAMA 2012 May; 307 (18): 1941-51.

120. Alvarez-Gregori JA, Robles NR, Mena C, Ardanuy R, Jauregui R, Macías Núñez JF. The value of a formula including haematocrit, blood urea and gender (HUGE) as a screening test for chronic renal insufficiency. J Nutr Health Aging 2011 Jun; 15 (6): 480-4.

121. Parmar MS. Chronic renal disease. BMJ 2002 Jul; 325: 85-90.

122. Ershler WB, Sheng S, McKelvey J, Artz AS, Denduluri N, Tecson J, et al. Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis. J Am Geriatr Soc 2005 Aug; 53 (8): 1360-5.

123. Symeonidis A, Kouraklis-Symeonidis A, Psiroyiannis A, Leotsinidis M, Kyriazopoulou V, Vassilakos P, et al. Inappropriately low erythropoietin response for the degree of anemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Ann Hematol 2006 Feb; 85 (2): 79-85.

124. Bohlius J, Schmidlin K, Brillant C, Schwarzer G, Trelle S, Seidenfeld J, et al. Recombinant human erythropoiesis-stimulating agents and mortality in patients with cancer: a meta-analysis of randomised trials. Lancet 2009 May; 373 (9674): 1532-42.

125. Tonelli M, Hemmelgarn B, Reiman T, Manns B, Reaume MN, Lloyd A, et al. Benefits and harms of erythropoiesis-stimulating agents for anemia related to cancer: a meta-analysis. CMAJ 2009 May; 180(11): E62-71.

126. Elzen WPJ, Willems JM, Westendorp RGJ, Craen AJM, Blauw GJ, Ferrucci L, et al. Effect of erythropoietin levels on mortality in old age: the Leiden 85-plus Study. CMAJ 2010 Dec; 182 (18): 1953-8.

127. Ergen AV, Goodell MA. Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. Exp Gerontol 2010 Apr; 45 (4): 286-90.

128. Rossi DJ, Bryder D, Weissman IL. Hematopoietic stem cell aging: mechanism and consequence. Exp Gerontol 2007 May; 42 (5): 385-90.

129. Corey SJ, Minden MD, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. Nat Rev Cancer 2007 Feb; 7 (2): 118-29.

130. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RAJ. The ageing immune system: is it ever too old to become young again?. Nat Rev Immunol 2009 Jan; 9 (1): 57-62.

131. Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. PLoS Biol 2007 Aug; 5 (8): 1750-62.

132. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. Proc Natl Acad Sci USA 2005 Jun; 102 (26): 9194-9.

133. Weng NP. Aging of the immune system: How much can the adaptive immune system adapt?. Immunity 2006 May; 24 (5): 495-9.

134. Maciejewski JP, Risitano A. Hematopoietic stem cells in aplastic anemia. Arch Med Res 2003 Nov-Dec; 34 (6): 520-7.

135. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. J Clin Invest 1993 Feb; 91 (2): 379-87.

136. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. FASEB J 1995 Jul; 9 (10): 866-73.

137. Chen M, Geng JG. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2006 Mar-Apr; 54 (2): 75-84.

138. Means RT, Krantz SB. Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. Blood 1991 Nov; 78 (10): 2565-7.

139. Minoo P, Zadeh MM, Rottapel R, Lebrun JJ, Ali S. A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine- receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. Blood 2004 Feb; 103 (4): 1398-407.

140. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. Mech Ageing Dev 2007 Jan; 128 (1): 92-105.

141. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, et al. The origins of age-related proinflammatory state. Blood 2005 Mar; 105 (6): 2294- 9.

142. Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, et al. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. Infect Immun 2000 Apr; 68 (4): 2259-67.

143. Ganz T. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. Pediatr Blood Cancer 2006 May; 46 (5): 554-7.

144. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, et al. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro: contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. J Clin Invest 1995 Aug; 96 (2): 1085-92.

145. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. J Am Soc Nephrol 2009 Jan; 20 (1): 223-8.

Relatório de Estágio
Laboratório Dra. Susana Pinto

Ana Rita Nunes Andrade

Trabalho realizado sob a orientação da Dra Susana Pinto

Setembro, 2012

Agradecimentos

O presente relatório de estágio representa o desfecho do estágio profissional realizado no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas. Este estágio foi concretizado com o apoio, colaboração e carinho de diversas pessoas extremamente importantes para superar esta etapa da minha vida.

Ao Professor Doutor Franklin Marques e à Professora Doutora Maria de São José Alexandre pela atribuição do local de estágio.

À Dra. Susana Pinto pela cedência do seu laboratório para realização deste estágio profissional e pela orientação do relatório escrito.

À Dra. Inês Ribeiro por toda a disponibilidade, paciência e auxílio durante a realização deste estágio. Por todas as explicações, críticas construtivas e sugestões adequadas que foram muito úteis para aumentar os meus conhecimentos no âmbito das Análises Clínicas.

Aos técnicos de análises clínicas Mariana Loureiro e Miguel Barbosa por toda a atenção e ajuda no setor de Bioquímica.

A todos os outros elementos do laboratório pela simpatia que sempre demonstraram para comigo.

Um agradecimento especial à Ana Rodrigues e à Juliana Rodrigues pelo companheirismo, amizade e alegria essenciais para a realização deste estágio.

A todos muito obrigada

Índice

Agradecimentos i
Índice de Figuras v
Índice de Tabelas vi
Lista de abreviaturas e símbolos viii
Introdução 1
Sistema de gestão de qualidade 2
Controlo de qualidade 2
Controlo de qualidade interno (CQI) 2
Controlo de qualidade externo (CQE) 3
Fluxograma da rotina laboratorial 4
1 - BIOQUÍMICA 5
1.1. Soro 5
1.1.1. Hidratos de carbono 6
1.1.1.1. Glicose 6
1.1.1.2. Diabetes *Mellitus* 7
1.1.2. Lípidos 8
1.1.2.1. Colesterol 8
1.1.2.2. Triglicerídeos 9
1.1.3. Função Renal 10
1.1.3.1. Creatinina 10
1.1.3.2. Ureia 11
1.1.3.3. Ácido úrico 11
1.1.4. Função hepática 12
1.1.4.1. Bilirrubina 12
1.1.4.2. Aspartato aminotransferase 14
1.1.4.3. Alanina aminotransferase 14
1.1.4.4. Fosfatase alcalina 15
1.1.5. Proteínas 15
1.1.5.1. Proteínas totais 15
1.1.5.2. Albumina 16
1.1.6. Eletroforese de proteínas séricas 17
1.2. Sangue total 19
1.2.1. Hemoglobina glicada 19
1.3. Urina 20
1.3.1. Função Renal 20
1.3.1.1. Microalbuminúria 20

1.3.1.2. *Clearance* da creatinina 20
1.3.2. Pesquisa de gonodotrofina coriónica humana na urina 21
1.3.3. Urina tipo II 21
1.3.4. Sedimento urinário 25
1.4. Fezes 27
1.4.1. Pesquisa de sangue oculto 27
1.5. Análises executadas em laboratório externo 27
2 – SEROLOGIA 28
2.1. VDRL (*Veneral Diseases Reference Laboratory*) e TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*) 28
2.1.1. VDRL (*Veneral Diseases Reference Laboratory*) 28
2.1.2. TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*) 29
2.2. Pesquisa de Proteína c reativa 30
2.3. Pesquisa de Fator Reumatoide 30
2.4. Reação de Waaler Rose 31
2.5. Reação de Paul-Bunnel 31
2.6. Reação de Wright 32
2.7. Reação de Widal 32
2.8. Reação de Weil Félix 33
3 – MICROBIOLOGIA 35
3.1. Meios de Cultura 35
3.2. Galerias de identificação e galerias de antibiogramas 38
3.3. Condições de assepsia 40
3.4. Provas complementares de identificação 40
3.4.1. Coloração de Gram 40
3.4.2. Coloração de Ziehl-Neelsen 40
3.4.3. Prova da oxidase 40
3.4.4. Prova da catalase 41
3.4.5. Prova da coagulase 41
3.4.6. Prova da filamentação 42
3.5. Urina 42
3.5.1. Exame microbiológico da urina 42
3.5.2. Pesquisa de *Chlamydia* na urina masculina 43
3.6. Fezes 44
3.6.1. Exame bacteriológico e micológico de fezes 45
3.6.2. Exame parasitológico de fezes 45
3.7. Outros produtos 46

3.7.1. Exsudado vagino-retal para a pesquisa de *Streptococcus agalacteae* 46
3.7.2. Exsudado vaginal.....47
3.7.3. Exsudado uretral 50
3.7.4. Exsudado purulento 51
3.7.5. Exsudado auricular.....52
3.7.6. Expetoração 52
3.7.6.1. Expetoração para pesquisa direta e cultural de Bacilo de Koch 54
4 – HEMATOLOGIA.....56
4.1. Hemograma 56
4.2. Esfregaços sanguíneos 57
4.3. Velocidade de sedimentação 57
4.4. Contagem dos reticulócitos.....58
4.5. Grupos sanguíneos - Sistema ABO e Sistema Rhesus 59
4.5.1. Sistema ABO 60
4.5.2. Sistema Rhesus.....60
4.6. Prova de Coombs.....62
4.6.1. Prova de Coombs indireta.....62
4.7. Coagulação 63
4.7.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada 65
4.7.2. Tempo de protrombina e INR 66
Conclusão.....67
Bibliografia 68

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da rotina laboratorial.....4
Figura 2 - Autoanalisador de bioquímica Olympus AU 600.....5
Figura 3 - Diagrama esquemático do diagnóstico de diabetes *Mellitus*.....7
Figura 4 - Aparelho Microgel que efetua a eletroforese das proteínas séricas em gel de agarose.....17
Figura 5 - Perfil eletroforético normal das proteínas séricas.....18
Figura 6 - Sistema de urianálise URISYS 2400, da Roche, para a determinação da urina tipo II.....22
Figura 7 - Representação esquemática dos procedimentos serológicos (excetuando o do TPHA).....28
Figura 8 - Imagem relativa ao resultado do teste VDRL (1-reativo; 2-não reativo).....29
Figura 9 - Imagem relativa a um possível resultado do teste TPHA (nos dois poços à esquerda o resultado é positivo e nos dois poços à direita é negativo).....30
Figura 10 - Resultado positivo (à esquerda) e negativo (à direita) relativo à pesquisa de CRP.....30
Figura 11 - Possíveis resultados da reação de Widal, utilizando os antigénios *Salmonella typhi* antigénio H; *Salmonella typhi* antigénio O; *Salmonella paratyphi* grupo A antigénio H; *Salmonella paratyphi* grupo B antigénio H (da esquerda para a direita, respetivamente) e com reação negativa nas cavidades 6, 7 e 8 e positiva na cavidade 9).....33
Figura 12 - Possível resultado da reação de Weil-Félix utilizando os antigénios *Proteus* OX19; *Proteus* OX2; *Proteus* OXK (da esquerda para a direita, respetivamente). Nas cavidades à esquerda e ao centro – resultado positivo e na cavidade à direita – resultado positivo.....34
Figura 13 - Descrição das galerias de identificação bacteriana ID32 E (08), ID32 E RAPID (08) e ID32 E STAPH (08).....38
Figura 14 - Descrição das galerias de antibiogramas ATB™ UR EU (08), ATB™ STAPH EU (08) e ATB™ PSE EU (08) 39
Figura 15 - Aparelho mini API®, da bioMérieux.....39
Figura 16 - Representação esquemática do processamento de amostras de urina para análise bacteriológica.....43
Figura 17 - Representação esquemática do processamento de amostras de fezes para exame microbiológico.....45

Figura 18 - Representação esquemática do processamento de amostras de exsudados vagino-retais, para pesquisa de *S. agalactiae*, em mulheres grávidas.....47
Figura 19 - Representação esquemática do processamento de exsudados vaginais, para análise microbiológica.....48
Figura 20 - Representação esquemática do processamento de exsudados uretrais, para análise microbiológica.....51
Figura 21 - Representação esquemática do processamento de exsudados purulentos, para análise microbiológica.....52
Figura 22 - Representação esquemática do processamento da expetoração para exame direto e cultural.....54
Figura 23 - Representação esquemática do processamento da expetoração para pesquisa direta e cultural de *Mycobacterium tuberculosis*.....55
Figura 24 - Autoanalisador de hematologia Coulter HMX, da Beckman.....57
Figura 25 - Autoanalisador TEST 1 THL, da ALIFAX, usado para a determinação da VS.....58
Figura 26 - Representação de algumas situações onde pode ocorrer reticulocitose (à esquerda) e reticulocitopenia (à direita).....59
Figura 27 - Vias intrínseca, extrínseca e comum do mecanismo de coagulação in vitro e fatores de coagulação incluídos em cada uma delas.....64
Figura 28 - Aparelho Option 4 Plus, utilizado para a determinação do TTPa e TP.....64

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Controlo positivo e controlo negativo relativos à coloração de Gram e teste da catalase, resultados previstos e frequência com que estes controlos são efetuados.....3
Tabela 2 - Princípios reacionais que ocorrem na determinação dos diferentes parâmetros na urina, efetuados pelo analisador URYSIS 2400 22
Tabela 3 - Meios utilizados para a pesquisa de microrganismos em diversas amostras biológicas. 35
Tabela 4 - Características da *Neisseria gonorrhoeae* e microscopia observada.....49
Tabela 5 - Características da *Gardenerlla vaginalis*, aspeto microscópico e isolamento em meio de cultura 49
Tabela 6 - Características da *Trichomonas vaginalis,* deteção microscópica do parasita e manifestações clínicas frequentemente observadas na mulher e no homem 50
Tabela 7 – Características microscópicas e culturais do *Mycobacterium tuberculosis*.....54

Tabela 8 - Principais genótipos, fenótipos, antigénios e anticorpos naturais relativos ao sistema ABO 60
Tabela 9 - Possíveis fenótipos relativos ao sistema ABO e Rhesus.....61
Tabela 10 - Definições de prova de Coombs direta e indireta e situações em que estas provas podem ser utilizadas. 62

Lista de abreviaturas e símbolos

^{0} - graus

^{0}C - graus Celsius

ADH - Hormona antidiurética

ADP - Adenosina difosfato

AGJ - Anomalia da Glicemia em Jejum

Alb - Albumina

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

ATB - Antibiograma

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

CHE - Colesterol esterase

CHGM - Concentração de hemoglobina globular média

CHO - Colesterol oxidase

CLED - *Cystine Lactose Electrolyte Deficient*

CRP - Proteína c reativa

DPD - 3,5-Diclorofenil-tetrafluorbato

EDTA - Ácido etilenodiamina tetracético

G6P-DH - Glicose – 6 – fosfato desidrogenase

GB - Glóbulos brancos

GC - Gelose de Chocolate PolyVitex

GK - Glicerol cinase

GLDH - Glutamato desidrogenase

GOD - Glicose oxidase

GPO - Glicerol fosfato oxidase

GS - Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro

GV - Glóbulos vermelhos

Hb - Hemoglobina

HbA_{1c} - Hemoglobina glicada

hCG - Gonodotrofina coriónica humana

HDL - Lipoproteina de alta densidade (*High Density Lipoproteins*)

HDW - *Hemoglobin Distribution Width*

HGM - Hemoglobina globular média

HK - Hexoquinase

IDL - Lipoproteina de densidade intermédia (*Intermediate Density Lipoproteins*)

INR - *International normalized ratio*
ISI - Índice de sensibilidade internacional da tromboplastina
ITU - Infeções do trato urinário
LDH - Lactato desidrogenase
LDL - Lipoproteína de baixa densidade (*Low Density Lipoproteins*)
MADB - N,N-bis (4-sulfobutil) - 3,5-dimetilanilina
MDH - Malato desidrogenase
min - minutos
MPV - *Mean Platelet Volume*
MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina
MSA - Gelose Manitol Salt Agar
MSSA - *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina
NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)
NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reduzida)
PDW - *Platelet Distribution Width*
Pl - Plaquetas
P-LCR - Plaquetas gigantes
pNP - p-Nitrofenol
pNPP - p-Nitrofenilfosfato
POD - Peroxidase
PTGO - Prova de tolerância à glicose
PTH - Hormona da paratiroide
RDW - Coeficiente de variação eritrocitária (*Red cell distribution width*)
RNA - Ácido ribonucleico
rpm - Rotações por minuto
sd - Desvio padrão
TDG - Tolerância Diminuída à Glicose
TH - Tempo de hemorragia
TP - Tempo de protrombina
TPHA -*Treponema pallidum haemagglutination*
TT - Tempo de trombina
TTPa - Tempo de tromboplastina parcial ativada
UFC - Unidades formadoras de colónias
UV - Ultravioleta
VDRL - *Veneral Diseases Reference Laboratory*
VGM - Volume globular médio
VLDL - Lipoproteina de densidade muito baixa (*Very Low Density Lipoproteins*)

VS - Velocidade de sedimentação

Introdução

As análises clínicas são fundamentais no auxílio do diagnóstico, prognóstico, terapêutica e prevenção de diversas patologias.

A realização de um estágio num laboratório de análises clínicas permite adquirir competências para a execução de todos os procedimentos necessários ao processamento das amostras biológicas, bem como entender a metodologia utilizada e interpretar os resultados obtidos.

Este estágio foi realizado no laboratório de Análises Clínicas Dra. Susana Pinto, fundado em 1986, com sede na Rua da Regueira 22, Coimbrões, Vila Nova de Gaia. Associados a este laboratório central existem outros postos de colheita em Vila do Conde, Alvites, Espinho, Vila Meã, Santa casa da misericórdia de Vila do Conde e São Mamede Infesta, apresentando ainda um protocolo com um centro de reprodução medicamente assistida.

Este laboratório possui um corpo técnico qualificado para executar as valências de Hematologia, Bioquímica, Microbiologia, Imunologia, Endocrinologia, Serologia, Alergologia, Monitorização de fármacos e toxicologia clínica, constituído por uma diretora técnica, especialista em análises clínicas pela ordem dos farmacêuticos, uma diretora técnica-adjunta, especialista em análises clínicas pela ordem dos farmacêuticos, dois técnicos de análises clínicas, duas enfermeiras, uma auxiliar interna e externa de laboratório e duas rececionistas.

Os serviços encontram-se informatizados, possuindo vários computadores com ligação aos diferentes equipamentos, o que permite a informatização dos serviços, desde a abertura das credenciais até à emissão dos boletins.

O estágio que realizei neste laboratório teve duração de 450 h e contemplou as valências de a Bioquímica, Serologia, Microbiologia e Hematologia. As análises que realizei em cada uma destas valências serão abordadas ao longo do presente relatório de estágio.

Sistema de gestão de qualidade

Este laboratório adotou um sistema de gestão de qualidade, sendo cumpridos os requisitos da Norma NP EN ISO 9001, das Normas para o Laboratório Clínico da Ordem dos Farmacêuticos e do Manual das Boas Práticas Laboratoriais.

Controlo de qualidade

❖ Controlo de qualidade interno (CQI)

Setor Bioquímica

Olympus AU600

Os controlos *Precinorm* (controlo de nível normal) e *Precipath* (controlo de nível patológico) são introduzidos diariamente antes da realização das análises. São aceites valores compreendidos entre +/- 1sd (desvio padrão) das cartas controlo do mês anterior (ou mudança de lote do controlo). Entre +/- 1 sd e +/- 2 sd, aceitar apenas se aprovado pela diretora técnica. As calibrações são realizadas quando o controlo está fora dos limites aceites, quando se mudam os lotes dos reagentes ou de acordo com o intervalo de tempo predefinido pelo fornecedor. A calibração dos ionogramas é realizada diariamente.

Setor Serologia

Sempre que se executa um ensaio serológico é feito um controlo positivo e um controlo negativo.

Setor Hematologia

Coulter HMX

Os controlos Latron (1 e 2) são introduzidos no aparelho todos os dias no início do dia. Repetir se fora dos parâmetros. Existem dois controlos de sangue: controlo de sangue 5C (apresenta três níveis, I (normal), II (anormal) e III (anormal)) e o controlo de sangue 4C. Este último é passado uma vez por dia no início de cada dia, enquanto o controlo de sangue 5C só se passa em dois meses do ano (em todos os dias desses meses, alternando os diferentes níveis). Nestes meses não se passa o controlo de sangue 4C.

Fórmulas leucocitárias

Uma lâmina por semana é observada por dois observadores diferentes.

Coagulação

"Pool" de plasmas normais para controlo das amostras. Para cada novo lote faz-se uma curva de calibração com plasma de referência.

Setor Microbiologia

Meios de cultura

O controlo é feito a cada lote de novos meios. Coloca-se uma placa de cada meio, devidamente identificada a 37^0 C durante 48 h (a de meio adequado ao isolamento de fungos, durante 5 dias à temperatura ambiente).

- Exame macroscópico: observar se há crescimento bacteriano; observar eventual desidratação (meios com ranhuras ou descolados da parede da placa devem ser inutilizados); cor (comparar com lote anterior e se for diferente voltar a determinar pH); transparência do meio (observar presença de turvação ou precipitado).
- pH: verificar o pH (pode variar +/- 2 do valor especificado pelo fabricante).

Reagentes e corantes

Utilização de microrganismos para visualizar reações positivas e negativas. (Tabela 1)

Tabela 1 – Controlo positivo e controlo negativo relativos à coloração de Gram e teste da catalase, resultados previstos e frequência com que estes controlos são efetuados.

Teste	Controlo positivo	Resultado previsto	Controlo negativo	Resultado previsto	Frequência das provas
Gram (lâminas)	*Staphylococcus aureus*	Microrganismos com cor púrpura	*E.coli*	Microrganismos corados de rosa	Sempre que se muda de lotes; e de 15 em 15 dias
Água oxigenada	*Staphylococcus aureus*	Revela efervescência	-	-	Uma vez por semana

Galerias de identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos

Utilizam-se estirpes ATCC (*American Type Culture Collection*) Gram negativa (-) (*E. Coli*) e Gram positiva (+) (*Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA)), da bioMérieux, para controlo das galerias de identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos, uma vez por mês, intercaladamente. As galerias são testadas com estas estirpes porque são as que aparecem com maior frequência como causadoras de infeções, neste laboratório.

❖ Controlo de qualidade externo (CQE)

Setor Bioquímica

O laboratório estabeleceu um acordo com a *Roche Diagnostics* e, segundo esse acordo, os valores obtidos para o controlo de nível normal e de nível patológico são enviados para a instituição avaliadora no final de cada mês.

Fluxograma da rotina laboratorial

Neste laboratório a rotina laboratorial desenrola-se de acordo com a figura 1.

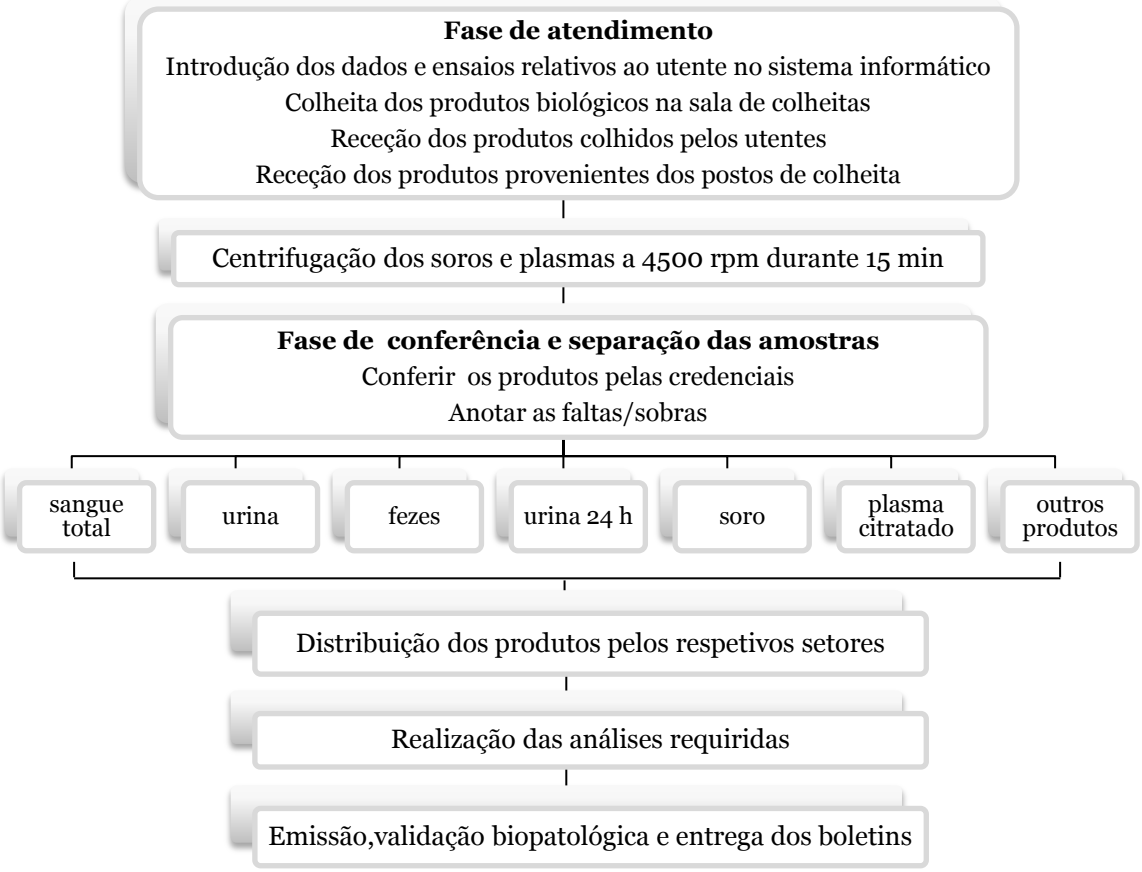

Fase de atendimento
Introdução dos dados e ensaios relativos ao utente no sistema informático
Colheita dos produtos biológicos na sala de colheitas
Receção dos produtos colhidos pelos utentes
Receção dos produtos provenientes dos postos de colheita
Centrifugação dos soros e plasmas a 4500 rpm durante 15 min
Fase de conferência e separação das amostras
Conferir os produtos pelas credenciais
Anotar as faltas/sobras
sangue total
urina
fezes
urina 24 h
soro
plasma citratado
outros produtos
Distribuição dos produtos pelos respetivos setores
Realização das análises requiridas
Emissão,validação biopatológica e entrega dos boletins

Figura 1 – Representação esquemática da rotina laboratorial.

A rotina laboratorial divide-se em três fases distintas designadas por:

➲ **Fase pré-analítica -** Engloba todos os processos que antecedem o processamento analítico, como sejam o atendimento (inclui interrogatório ao utente sobre a farmacoterapia, estado de jejum no caso de as análises a determinar o requererem, etc), colheitas, manuseamento distribuição e conservação das amostras, e a conferência e separação das amostras.

➲ **Fase analítica -** Inclui a receção e verificação das amostras biológicas e das listas de trabalho, assim como a realização e validação técnica por cada valência. Com base nas listas de trabalho e nas amostras/alíquotas (identificadas e separadas) as técnicas são efetuadas conforme descrito nos respetivos procedimentos técnicos, tendo em consideração os controlos de qualidade interno e externo. O funcionamento adequado dos instrumentos e materiais utilizados é fundamental para obter resultados corretos. Após serem processadas, as amostras são armazenadas, em ambiente refrigerado, para uma eventual repetição das análises.

➲ **Fase pós-analítica -** Inclui os processos subsequentes ao processamento analítico: emissão, validação biopatológica e entrega dos boletins analíticos ao respetivo utente.

1 - BIOQUÍMICA

Depois da fase de conferência e separação, os tubos primários contendo soros e as alíquotas seguem para o setor de Bioquímica. Neste setor as análises são executadas essencialmente por sistemas automáticos. Os autoanalisadores presentes neste setor são o Olympus AU600, o Elecsys 2010 e o Cobas e411, os dois últimos da Roche. O autoanalisador que efetua a maioria das determinações bioquímicas é o Olympus AU600. (Figura 2)

O Axsym, da Abbott, é outro autoanalisador existente, porém realiza maioritariamente determinações do foro imunológico, endocrinológico e monitorização de fármacos (não abordados no presente relatório).

A análise da urina é executada pelo autoanalisador Urysis 2400, da Roche.

Relativamente a esta valência irei abordar algumas das análises bioquímicas efetuadas, utilizando amostras de soro, sangue total, urina e fezes.

Figura 2 – Autoanalisador de bioquímica Olympus AU 600.

1.1. Soro

- Tubos para colheita de soro

Os tubos para obtenção de soro não contêm anticoagulante, por isso ocorre o processo de coagulação. Depois dos tubos serem centrifugados a 4500 rpm, durante 15 min obtém-se o soro no sobrenadante, o coágulo no sedimento e um gel que os separa. O soro é utilizado para determinações bioquímicas, imunológicas, serológicas e endocrinológicas.

O autoanalisador bioquímico visualizado na figura 2 realiza uma elevada quantidade de determinações analíticas úteis para avaliar diversas funções do organismo humano. De seguida, irei focar alguns dos doseamentos efetuados por este autoanalisador fazendo uma abordagem ao analito e ao princípio utilizado na sua determinação.

1.1.1. Hidratos de carbono

1.1.1.1. Glicose

Os hidratos de carbono ingeridos na dieta alimentar são digeridos em monossacarídeos simples no trato gastrointestinal, para serem absorvidos. A glicose é o monossacarídeo comum a todos os hidratos de carbono do organismo. (1)

Em jejum, os níveis de glicose no sangue são controlados pelo fígado e pelo pâncreas, que garantem a manutenção dentro dos limites exatos.

As oscilações nos níveis de glicose sanguínea dependem da atividade muscular e da ingestão de alimentos e variam substancialmente em condições patológicas nas quais a concentração de glicose no sangue está elevada (hiperglicemia) ou reduzida (hipoglicemia). (2)

A determinação da glicose sanguínea pode ser feita de várias formas:

- Glicose em jejum;
- Glicose em jejum e pós-prandial:
  1) Doseamento da glicose ao tempo 0';
  2) Doseamento às 2 h após uma refeição - para verificar se o valor de glicose se encontra estabilizado;
- Prova de Tolerância Oral à Glicose (PTGO). Nesta prova o doente adulto ingere 75 g de glicose anidra em 250-300 mL de água, após uma recolha de sangue ao tempo 0'.[1] Ao fim de 2 h é feita nova colheita de sangue. Nas crianças a dose oral de glicose é determinada tendo em conta o peso corporal: 1,75 g de glicose por Kg.

Princípio do ensaio

- Ensaio enzimático no UV (método da hexoquinase) para a determinação quantitativa de glicose no soro.

Reações

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK, } Mg^{2+}} \text{Glicose-6-fosfato} + \text{ADP}$$

$$\text{Glicose-6-fosfato} + NAD^{+} \xrightarrow{\text{G6P-DH}} \text{6 -fosfogliconato} + \text{NADH} + H^{+}$$

O aumento na absorvância a 340 nm é proporcional à concentração de glicose na amostra. (2)

[1] Atualmente existem recipientes que contêm soluções de glicose pré-preparadas com 50 g, 75 g e 100 g de glicose.

1.1.1.2. Diabetes *Mellitus*

A diabetes é um conjunto de doenças metabólicas, de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crónica, com alteração do metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, devido a defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou em ambas. (3)

A insulina é uma hormona produzida pelas células β pancreáticas que tem um papel fundamental na regulação dos níveis sanguíneos de glicose. Esta hormona age através de recetores membranares atuando principalmente no fígado, músculo e tecido adiposo, promove a incorporação de glicose pelo músculo e tecido adiposo, a glicólise, a síntese de glicogénio, síntese de proteínas e inibe a gliconeogénese, glicogenólise, lipólise, cetogénese e proteólise. A glicagina, a adrenalina, a hormona do crescimento e os glicocorticoides têm efeito contrário ao da insulina. (1)

O diagnóstico de diabetes *Mellitus* pode ser feito mediante uma das quatro opções indicadas na figura 3.

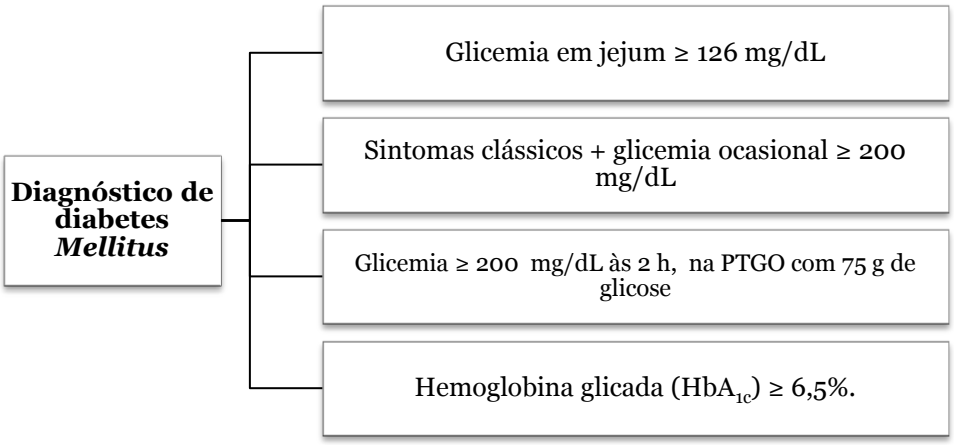

Diagnóstico de diabetes *Mellitus*
Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL
Sintomas clássicos + glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL
Glicemia ≥ 200 mg/dL às 2 h, na PTGO com 75 g de glicose
Hemoglobina glicada (HbA_{1c}) ≥ 6,5%.

Figura 3 – Diagrama esquemático do diagnóstico de diabetes *Mellitus* (adaptado de (4)).

Num indivíduo assintomático, o diagnóstico de diabetes não deve ser feito com base num único valor anormal de glicemia em jejum ou de HbA_{1c}, devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma a duas semanas. (4)

O diagnóstico de hiperglicemia intermédia ou a identificação de elevado risco para desenvolver diabetes faz-se com base nos seguintes parâmetros:

a) Anomalia da Glicemia em Jejum (AGJ): glicemia em jejum ≥ 110 e <126 mg/dL;

b) Tolerância Diminuída à Glicose (TDG): glicemia às 2h na PTGO ≥ 140 e <200 mg/dL. (4)

A diabetes pode ser classificada em vários tipos:

- **Tipo 1** - Há destruição das células β dos ilhéus de Langerhans do pâncreas o que leva a insulinopenia absoluta, sendo a insulinoterapia indispensável para assegurar

a sobrevivência. Na maioria dos casos, a destruição das células dá-se por um mecanismo autoimune, pelo que se denomina diabetes tipo 1 autoimune. Nos casos em que não se consegue fundamentar a existência de um processo imunológico, denomina-se por diabetes tipo 1 idiopática. Nas crianças e jovens o tipo de diabetes mais comum é a diabetes *Mellitus* tipo I. (3)

- **Tipo 2** - É a forma mais comum de diabetes e é caracterizada por distúrbios na secreção (insuficiência de células β pancreáticas) ou na ação da insulina (resistência dos tecidos periféricos às ações da insulina, de tal modo que os níveis de insulina podem ser normais ou até elevados). (3)
- **Diabetes gestacional** - Corresponde a qualquer grau de anomalia do metabolismo da glicose identificado, pela primeira vez, durante a gravidez. A hormona placentária, o cortisol e os estrogénios bloqueiam a ação da insulina. Para compensar há um aumento da produção materna de insulina. Com isto ocorre um aporte excessivo de glicose para o feto, o que leva a uma produção exaustiva de insulina pelo mesmo, com consequente macrossomia. Após o parto o recém-nascido pode entrar em hipoglicemia com excesso de insulina. Na gravidez, a prova de tolerância à glicose é realizada às 0, 1 e 2 h. (3)
- **Outros tipos específicos de diabetes** - Defeitos genéticos da célula ß; defeitos genéticos na ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; endocrinopatias diversas; diabetes induzida por químicos ou fármacos. (3)

A este laboratório chegam diversas credenciais que solicitam a determinação da glicose, $HbA_{1C,}$ urina tipo II com sedimento e microalbuminúria, que permitem o controlo diabético.

1.1.2. Lípidos

1.1.2.1. Colesterol

Resumo

O colesterol é sintetizado de modo permanente em todo o organismo e é um componente essencial das membranas e lipoproteínas e um precursor para a síntese de hormonas esteroides e ácidos biliares. A diminuição da sua concentração plasmática reduz a incidência de doenças coronárias. Devido à sua insolubilidade é transportado no plasma por complexos macromoleculares designados por lipoproteínas, que se distinguem pelas diferenças na densidade, composição, função e estrutura (Quilomicrons, *Very Low Density Lipoproteins* (VLDL), *Intermediate Density Lipoproteins* (IDL), *Low Density Lipoproteins* (LDL), *High Density Lipoproteins* (HDL). O colesterol é transportado sobretudo pelas LDL e HDL, as quais desempenham um papel contraditório na

patogénese das perturbações lipídicas. A LDL é a principal transportadora do colesterol para os tecidos, enquanto a HDL tem função protetora, uma vez que transporta o colesterol dos tecidos extra-hepáticos para o fígado de modo a que seja excretado. A concentração de colesterol total permite-nos verificar se são necessárias mais investigações laboratoriais do metabolismo das lipoproteínas (HDL e LDL). [1, 5]

Princípio do ensaio

- Ensaio enzimático colorimétrico para a determinação de colesterol total no soro e plasma humanos.

Reações

2 Ésteres de colesterol + 2 H2O $\xrightarrow{CHE}$ 2 colesterol + 2 ácido gordo

2 Colesterol + 2 O_2 $\xrightarrow{CHO}$ 2 colesteno-3-ona + 2 H_2O_2

2 H_2O_2 + 4-aminoantipirina + fenol $\xrightarrow{POD}$ quinoneimina + 4 H_2O

O corante vermelho de quinoneimina pode ser medido espetrofotometricamente a 540/600 nm, sendo proporcional à concentração de colesterol na amostra. [5]

1.1.2.2. Triglicerídeos

Resumo

Os triglicerídeos são os ésteres de colesterol mais prevalentes na alimentação humana. Após absorção intestinal, estes são ressintetizados nas células epiteliais intestinais e, combinados com o colesterol e a apolipoproteina B formam os quilomicrons. [6]

A determinação dos triglicerídeos pode ser utilizada para o diagnóstico e tratamento de doentes com pancreatite aguda e crónica, Diabetes *Mellitus*, alcoolismo, obstrução biliar extra-hepática e outras patologias que envolvam o metabolismo lipídico. [6]

Princípio do ensaio

- Ensaio enzimático colorimétrico para a determinação de triglicerídeos.

Reações

Triglicerídeos +3 H_2O $\xrightarrow{Lipase}$ glicerol + 3 ácidos gordos

Glicerol + ATP $\xrightarrow{GK,\ MG^{2+}}$ glicerol-3-fosfato + ADP

Glicerol-3-fosfato + O_2 $\xrightarrow{GPO}$ dihidroxiacetona fosfato + H_2O_2

H_2O_2 + 4-AAP + MADB $\xrightarrow{POD}$ corante azul + OH^- + 3 H_2O

O cromóforo é lido espetrofotometricamente a 660/800 nm. O aumento da absorvância é proporcional ao conteúdo de triglicerídeos na amostra. (6)

1.1.3. Função Renal

O rim é um órgão com diversas funções tais como a formação de urina, regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico, regulação do equilíbrio ácido-base, excreção de produtos do catabolismo de proteínas e ácidos nucleicos (ureia, creatinina, ácido úrico, creatina, fosfato e sulfatos) e conservação de proteínas. Ao longo dos túbulos renais ocorrem os processos de filtração, reabsorção e secreção. Os rins também possuem função endócrina primária (síntese de renina, prostaglandinas, eritropoietina) e secundária [local de atuação da aldosterona, vasopressina ou ADH (hormona antidiurética), PTH (hormona da paratiroide), local de degradação de insulina e glicagina e local de ativação da vitamina D-1,25-hidroxicolicalciferol]. (1)

Existem várias determinações bioquímicas que fornecem informações relevantes sobre a função renal, sendo algumas dessas a creatinina, ureia, ácido úrico, *clearance* da creatinina e microalbuminúria.

1.1.3.1. Creatinina

Resumo

A creatinina é sintetizada nos músculos a partir da creatina (sintetizada no fígado, rim e pâncreas) e da fosfocreatina (sintetizada no músculo e cérebro). Assim, a produção de creatinina é proporcional à massa muscular, variando pouco de dia para dia. Os seus níveis variam com o sexo e a idade. A creatinina é filtrada pelo glomérulo, sofre pouca reabsorção tubular e posteriormente sofre secreção tubular. Os seus níveis séricos refletem a produção endógena e a taxa de filtração glomerular. Deste modo, o doseamento da creatinina pode ser usado no diagnóstico e tratamento de doenças renais sendo particularmente útil na avaliação da filtração glomerular. (7)

Frequentemente a taxa de filtração glomerular é avaliada pela c*learance* da creatinina, referida mais à frente neste relatório.

Princípio do ensaio

- Ensaio de cor cinético (Método de Jaffé) para a determinação quantitativa de creatinina no soro, plasma e urina humanos.

Reação

Creatinina + Ácido pícrico $\xrightarrow[\text{alcalino}]{\text{pH}}$ complexo picrato de creatinina (cor amarelo-alaranjado)

A alteração da absorvância a 520/800 nm é proporcional à concentração de creatinina na amostra. (7)

1.1.3.2. Ureia

Resumo

A ureia é sintetizada no fígado como produto final do catabolismo das proteínas. Deste modo, a síntese de ureia depende da ingestão diária de proteínas e do metabolismo endógeno das mesmas. A ureia é filtrada pelo glomérulo, reabsorvida pelos túbulos renais (40-70%), sendo posteriormente segregada a nível tubular. Os níveis séricos de ureia elevados podem-se correlacionar com patologias pré-renais (desidratação, estados catabólicos), renais (glomerulonefrites, insuficiência renal aguda e crónica), e pós-renais (nefropatia obstrutiva), mas também podem ser devidos apenas a dietas com alto teor proteico. Uma diminuição da concentração sérica de ureia pode estar associada a uma dieta pobre em proteínas, porém também pode ser consequência de diversas patologias como a insuficiência hepática e a baixa secreção de ADH (induz a reabsorção de água e conjuntamente ocorre reabsorção de ureia). (8)

Princípio do ensaio

- Ensaio cinético no UV para a determinação quantitativa de ureia no soro, plasma e urina de humanos.

Reações

$$\text{Ureia} + 2\ H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2\ NH^{4+} + CO_3^{2-}$$

$$\text{2-oxoglutarato} + 2\ NH_4^+ + 2\ \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} 2\ \text{L-glutamato} + 2\ NAD^+ + 2\ H_2O$$

A diminuição da absorvância do NADH, por unidade de tempo, é proporcional à concentração de ureia. (8)

1.1.3.3. Ácido úrico

Resumo

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas no ser humano. É formado na sua maioria no fígado e eliminado pelos rins, havendo um equilíbrio entre a sua síntese e eliminação. A hiperuricemia pode ser consequência de sobreprodução ou eliminação reduzida de ácido úrico e pode ser dividida em primária e secundária. A hiperuricémia primária, na grande maioria dos casos, é devida à diminuição da eliminação tubular de ácido úrico. Numa minoria dos casos, é devida a uma deficiência enzimática no metabolismo das purinas. A hiperuricemia primária está associada à gota, síndrome de

Lesch-Nyhen e a um aumento da atividade da fosforibosil-pirofosfato sintetase. A hiperuricemia secundária pode ser causada pela absorção acrescida de purina nutricional, associada ao aumento da excreção de ácido úrico através da urina. A hipouricémia pode resultar da baixa produção de ácido úrico, tal como acontece na xantinúria hereditária, deficiência em nucleósido fosforilase e na terapia com alopurinol (suprime a síntese de purinas). Também pode ser causada pelo aumento da excreção renal de ácido úrico que pode ocorrer em patologias como a Diabetes *Mellitus*, síndrome de Fanconi, entre outras. (9)

Princípio do ensaio

- Ensaio de cor enzimático para a determinação quantitativa de ácido úrico no soro, plasma e urina humanos.

Reações

$$\text{Ácido úrico} + O_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Alantoína} + CO_2 + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{MADB} + \text{4-Aminifenazona} \xrightarrow{\text{POD}} \text{corante azul}^+ + OH^- + 3H_2O$$

A absorvância é lida a 660/800 nm, sendo a quantidade de corante formado proporcional à concentração de ácido úrico na amostra. (9)

1.1.4. Função hepática

O fígado é um órgão com extrema importância no organismo humano, desempenhando um importante papel na homeostasia das proteínas, hidratos de carbono e lípidos. Nos hepatócitos realizam-se vários processos metabólicos como a glicólise, ciclo de Krebs, síntese e degradação de aminoácidos e fosforilação oxidativa. (1)

Existem diversos doseamentos séricos que auxiliam no diagnóstico das patologias hepáticas, tais como a determinação da bilirrubina total, bilirrubina direta, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP).

1.1.4.1. Bilirrubina

Cerca de 80-85% da bilirrubina tem origem na hemoglobina (Hb) libertada pela decomposição dos eritrócitos senescentes e os restantes 15-20% resultam da rutura de proteínas que também contêm grupo heme tais a mioglobina, citocromos, catalase e da medula óssea em resultado da eritropoiese ineficaz. (10) Em virtude de possuir uma fraca solubilidade em água, a bilirrubina não conjugada (bilirrubina indireta) é transportada para o fígado ligada à albumina. No interior dos hepatócitos conjuga-se rapidamente com o ácido glucurónico originando bilirrubina conjugada. Esta no intestino é metabolizada

por bactérias produzindo estercobilinogénio. Uma parte deste entra no ciclo enterohepático, outra parte é reabsorvida e excretada na urina como urobilinogénio e uma terceira parte é eliminada nas fezes, conferindo-lhe a cor acastanhada. Aquando de um bloqueio do trato biliar a bilirrubina não é excretada e a sua concentração sérica aumenta, levando a icterícia (cor amarelada da pele e da esclerótida). A bilirrubina em quantidades elevadas é neurotóxica, por isso, níveis elevados nos neonatos podem causar lesão cerebral. (1)

O aumento da bilirrubina no soro pode ser devido essencialmente a: hemólise (um aumento da degradação da Hb leva a uma sobrecarga no mecanismo hepático de conjugação da bilirrubina); mecanismo de conjugação incapacitado no interior do hepatócito; obstrução do sistema biliar. (1)

Dependendo da desordem a bilirrubina conjugada, não conjugada ou ambas contribuem para a hiperbilirrubinémia, que pode ser classificada da seguinte forma:

- **Icterícia pré-hepática** - As doenças de origem pré-hepática com hiperbilirrubinémia não conjugada incluem as anemias hemolíticas, como por exemplo talassemia e anemia falciforme, reação a transfusões de sangue por incompatibilidade do sistema ABO e Rhesus;
- **Icterícia hepática** - As doenças de origem hepática com hiperbilirrubinémia conjugada predominante incluem hepatite viral aguda e crónica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular;
- **Icterícia pós-hepática** - As doenças de origem pós hepática com aumento de bilirrubina direta incluem a colestase pós-hepática e rejeição de transplante hepático. (1)

Existem também doenças genéticas do metabolismo da bilirrubina que levam a hiperbilirrubinémia não conjugada ligeira como a doença de Gilbert, que é devida à conjugação defeituosa da bilirrubina, ou a uma deficiência no seu transporte. (1)

Bilirrubina direta

Atendendo que a icterícia pré-hepática leva a um aumento da bilirrubina não conjugada, a avaliação da bilirrubina direta revela-se útil na determinação da icterícia hepática e pós-hepática.

Princípio do ensaio

- Ensaio colorimétrico para a determinação quantitativa do total de bilirrubina direta no soro ou plasma humanos.

Reação

Bilirrubina + DPD $\xrightarrow{\text{pH ácido}}$ Azobilirrubina

A absorvância a 570 nm é proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra. (11)

Bilirrubina total

Reação

Bilirrubina (conjugada e não conjugada) + DPD $\xrightarrow[\text{Surfactante}]{\text{Cafeína}}$ Azobilirrubina

A absorvância a 540 nm é proporcional à concentração de bilirrubina total. (10)

1.1.4.2. Aspartato aminotransferase

Resumo

A AST é uma enzima encontrada numa grande variedade de órgãos e tecidos, entre os quais se incluem o fígado, músculo cardíaco e esquelético, cérebro, rins, pulmões, pâncreas, sendo a sua atividade mais elevada no fígado e no sistema musculoesquelético. Lesões hepatocelulares levam a um aumento da atividade desta enzima. (12)

Princípio do ensaio

- Ensaio UV cinético para a determinação quantitativa da AST no soro humano.

Reações

2-Oxoglutarato + L-Aspartato $\xrightarrow{\text{AST}}$ L-Glutamato + Oxaloacetato

Oxaloacetato + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-Malato + NAD^+

A redução da absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra. (12)

1.1.4.3. Alanina aminotransferase

Resumo

A ALT é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, e em menor quantidade no coração e músculo esquelético, por isso uma atividade sérica aumentada é geralmente indicadora de doenças do foro hepático (ex. hepatite vírica aguda, necrose aguda hepática devida à ingestão de toxinas como o paracetamol).(13)

Princípio do ensaio

- Ensaio UV cinético para a determinação quantitativa da ALT no soro humano.

Reações

2-Oxoglutarato + L-alanina $\xrightarrow{ALT}$ L-Glutamato + Piruvato

Piruvato + NADH + H^+ $\xrightarrow{LDH}$ L-lactato + NAD^+

A redução da absorvância devido ao consumo de NADH é medida a 340 nm sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra. [13]

1.1.4.4. Fosfatase alcalina

Resumo

A ALP encontra-se em quase todos os tecidos do organismo e está associada a membranas celulares. Apresenta-se em maior quantidade no epitélio intersticial, túbulos renais, ossos (osteoblastos), fígado e placenta. Esta enzima está associada ao transporte de lípidos a nível intestinal e à calcificação dos ossos. [14] O aumento da sua atividade na doença hepática resulta do aumento da sua síntese pelas células que revestem os canalículos biliares, geralmente em resposta à colestase intra ou extra-hepática. Esta enzima também pode estar aumentada em lesões infiltrativas do fígado, como por exemplo na presença de tumores. [1]

Princípio do ensaio

- Ensaio de cor cinético para a determinação quantitativa da ALP no soro humano.

Reação

p-Nitrofenilfosfato (pNPP) + H_2O $\xrightarrow[Mg^{2+}, pH\ 9.8]{ALP}$ fosfato + p-Nitrofenol (pNP)

O aumento da absorvância decorrente da formação de pNP é medido a 410/480 nm e é diretamente proporcional à atividade da ALP na amostra. [14]

1.1.5. Proteínas

1.1.5.1. Proteínas totais

Resumo

A determinação das proteínas totais é utilizada no diagnóstico e tratamento de diversas doenças que envolvem o fígado, rins, medula óssea, bem como outras perturbações metabólicas e nutricionais. Um desvio das proteínas totais séricas do intervalo de referência indica a presença de disproteinemia ou uma perturbação do equilíbrio da água.

Ambas as condições podem ser distinguidas através de uma análise adicional da eletroforese das proteínas séricas. [15]

Princípio do ensaio

- Ensaio colorimétrico para a determinação quantitativa das proteínas totais no soro humano.

Reação

Proteína + Cu^{2+} $\xrightarrow{OH^-}$ complexo azul-violeta

A absorvância deste complexo, a 540/660 nm, é diretamente proporcional à concentração de proteínas totais na amostra. [15]

1.1.5.2. Albumina

Resumo

A albumina é o principal produto proteico do fígado. É a proteína sérica mais abundante, representando cerca de 55-65% do total de proteínas. A albumina liga e solubiliza compostos não polares como a bilirrubina e os ácidos gordos de cadeia comprida, também estabelece ligação com alguns fármacos e é responsável pela pressão oncótica. Esta proteína é filtrada pelo glomérulo e reabsorvida ao nível tubular. Assim, nas patologias renais, como as glomerulonefrites, a albumina é eliminada em elevada quantidade na urina, o que leva a uma diminuição dos seus níveis séricos. Deste modo, a hipoalbuminémia pode ser provocada por síntese inadequada devido a patologia hepática, por dietas hipoproteicas, perda excessiva por doença renal, queimaduras graves, entre outras situações. Os níveis de albumina podem estar aumentados em situações de desidratação (sudorese excessiva, diarreia, vómitos) e estase venosa excessiva. [16]

Princípio do ensaio

- Ensaio colorimétrico para a determinação de albumina no soro humano.

Reação

Albumina + verde de bromocresol $\xrightarrow{pH\ 4,2}$ complexo verde

A absorvância deste complexo é medida a 600/800 nm, sendo proporcional à concentração de albumina na amostra. [16]

1.1.6. Eletroforese de proteínas séricas

Resumo

A eletroforese é uma técnica bastante versátil, utilizada na maioria dos laboratórios de análises clínicas para a separação das proteínas séricas. Cada proteína apresenta uma função biológica específica e os seus níveis séricos estão relacionados com o estado de saúde/doença. A eletroforese em gel de agarose permite obter cinco bandas: a albumina e quatro globulinas (contendo cada uma um diferente número de proteínas) - alfa 1 (α1), alfa 2 (α2), beta (β) e gama (γ). [17]

Neste laboratório a análise é realizada automaticamente pelo aparelho Microgel, da Interlab (Figura 4).

Figura 4 – Aparelho Microgel que efetua a eletroforese das proteínas séricas em gel de agarose.

Princípio do teste

A eletroforese separa as proteínas do soro de acordo com a sua mobilidade quando sujeitas a um campo elétrico. Todas as moléculas têm carga elétrica, devido à presença de grupos carregados positiva ou negativamente. A carga total define as características de migração eletroforética de cada proteína, a um dado pH. Neste procedimento as proteínas são separadas a um pH alcalino, utilizando o princípio da "eletroforese de zona", num suporte de gel de agarose. Quando a separação eletroforética está completa, as bandas são coradas com o reagente "amido black", é feita a leitura por densitometria e os resultados são apresentados graficamente. [18]

Interpretação dos resultados

➲ Albumina

Referenciada anteriormente na secção 1.1.5.2.

➲ α1-globulinas

Esta banda é constituída por várias proteínas tais como, α1-antitripsina (corresponde a 90% desta banda), α1-glicoproteína ácida, α-fetoproteína, protrombina, transcortina, globulina ligadora de tiroxina, α1-lipoproteína (HDL). [19]

Uma reação inflamatória pode levar a um aumento da banda α1, devido ao aumento das proteínas de fase aguda. Uma diminuição desta banda pode ocorrer devido a uma

deficiência em α1- antitripsina ou por uma diminuição da síntese de globulinas por doença hepática. [20]

➲ α2- globulinas

A α2-macroglobulina, ceruloplasmina, haptoglobina, eritropoetina e colinesterase são algumas proteínas constituintes da banda α2. [19] A α2-macroglobulina e a haptoglobina correspondem à maior parte dessa banda.

O aumento desta banda pode ocorrer em insuficiência adrenal, terapêutica adrenocorticosteroide, diabetes *Mellitus* e síndrome nefrótico. A diminuição pode estar associada a má nutrição, anemia megaloblástica, doença hepática severa e doença de Wilson´s. [20]

➲ β-globulinas

Esta banda pode ser dividida em β1 e β2. A β1 é constituída principalmente pela transferrina e a β2 por β-lipoproteínas (LDL e VLDL) e fatores de complemento (C3). A banda β também engloba a hemopexina, o fibrinogénio e a proteína c reativa (CRP). O decréscimo desta fração pode ser devido a malnutrição proteica, síndrome nefrótico e um aumento pode ocorrer em situações de cirrose, carcinoma, anemia ferripriva, hipertensão, alguns casos de diabetes *Mellitus*, hipotiroidismo, na gravidez entre outros. [20]

➲ γ-globulinas

A banda γ é constituída por imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Esta banda pode encontrar-se aumentada em doença hepática, infeção crónica, mieloma múltiplo policlonal ou monoclonal, e pode estar diminuída em leucemia linfoide crónica, doença das cadeias leves, entre outras. [20]

A maior parte dos perfis eletroforéticos obtidos neste laboratório apresentam um padrão normal. (Figura 5) Relativamente aos perfis patológicos, os que aparecem com maior frequência correspondem a processos inflamatórios agudos (aumento das bandas α1 e α2 e diminuição da albumina).

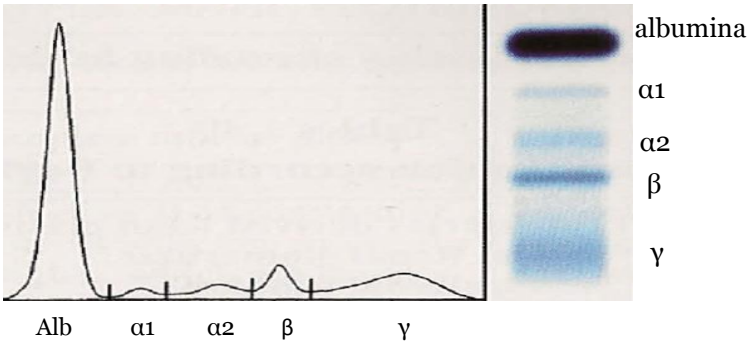


Figura 5 – Perfil eletroforético normal das proteínas séricas. [17]

1.2. Sangue total

- Tubos para colheita de sangue total

Os tubos para obtenção de sangue total contêm ácido etilenodiamina tetracético (EDTA) como anticoagulante, o qual tem a função de complexar o cálcio, essencial para o processo de coagulação, logo este processo não ocorre.

O sangue colhido no tubo com EDTA é usado para o doseamento da HbA_{1c} e para a maior parte das determinações hematológicas (referidas no capítulo 4).

1.2.1. Hemoglobina glicada

Resumo

A HbA_{1C} resulta da glicação não enzimática do terminal N da cadeia β da Hb A0. [21]

Este doseamento é útil para a monitorização de doentes com diabetes, porque a determinação da HbA_{1C} fornece uma indicação da concentração média diária de glicose sanguínea durante os dois meses precedentes à determinação. [21]

Esta determinação envolve uma fase de pré-tratamento da amostra, onde se mistura um reagente desnaturante de Hb com o sangue total. Incuba-se a solução à temperatura ambiente durante cerca de 5 min (a solução adquire coloração esverdeada). Durante este tempo os eritrócitos são fragmentados e a cadeia de Hb é hidrolisada através da protease presente no reagente. A Hb total é medida através da conversão de todos os derivados de Hb em hematina alcalina, numa solução alcalina de um detergente não iónico. [21]

Princípio do ensaio

- Ensaio de imunoinibição para a determinação quantitativa de HbA_{1C} em sangue humano.

A HbA_{1C} é medida num ensaio de inibição de aglutinação de látex. Um aglutinador (polímero sintético contendo múltiplas cópias da porção imunorreativa da HbA_{1C}) provoca a aglutinação do látex revestido com anticorpos específicos de HbA_{1C} de rato. Na ausência de HbA_{1C} na amostra, as partículas revestidas com anticorpo no HbA_{1C} R1 (reagente 1) e o aglutinador no HbA_{1C} R2 (reagente 2) serão aglutinados. A aglutinação leva a um aumento da absorvância. A presença de HbA_{1c} na amostra resulta numa diminuição da taxa de aglutinação entre o HbA_{1C} R1 e o aglutinador presente no reagente HbA_{1C} R2. Por conseguinte, o aumento da absorvância a 700 nm é inversamente proporcional à concentração de HbA_{1C} na amostra.

São determinadas as concentrações de HbA_{1C} e Hb total. A relação HbA_{1c}/Hb total é expressa como uma percentagem de HbA_{1C} (%HbA_{1C}). [21]

1.3. Urina

1.3.1. Função Renal

1.3.1.1. Microalbuminúria

Resumo

Uma das evidências clínicas de nefropatica é o aparecimento de níveis baixos, mas anormais, de albumina na urina, denominada microalbuminúria. Esta determinação é bastante utilizada no acompanhamento de doentes diabéticos, uma vez que a deterioração das funções renais é uma das complicações desta patologia. [22]

A determinação da microalbuminúria é feita em urina de 24 h pelo Olympus AU600.

Antes da determinação do analito, o volume das urinas de 24 h é anotado (uma vez que os resultados são expressos por min), as urinas são vertidas para tubos, devidamente etiquetados, que são centrifugados durante 5 min a 1500 rpm. A centrifugação permite que as células e componentes com maior peso molecular presentes na urina sejam depositados no sedimento, de modo a minimizar as interferências na determinação do analito pelo autoanalisador.

Princípio do ensaio

- Ensaio imunoturbidimétrico para a determinação de albumina na urina humana.

Reação

Quando a amostra é misturada com o tampão e a solução antissoro, a albumina humana reage especificamente com os anticorpos antialbumina humana produzindo agregados insolúveis. A absorvância destes agregados é proporcional à concentração de albumina na amostra. [22]

1.3.1.2. *Clearance* da creatinina

Resumo

A *clearance* é o volume de plasma, expresso em mL, do qual é totalmente eliminada uma substância na urina, por unidade de tempo (min). [1]

Para a determinação da c*learance* da creatinina o volume da urina de 24 h é anotado, a amostra é centrifugada a 1500 rpm durante 5 min e procede-se a uma diluição de 1:10 do sobrenadante em água destilada, sendo a análise posteriormente efetuada pelo autoanalisador Olympus AU600 (o princípio deste ensaio é o mesmo que o realizado na determinação da creatinina sérica).

A *clearance* da creatinina (representativa da taxa de filtração glomerular) pode então ser calculada a partir do conteúdo de creatinina numa amostra de urina de 24 h e da sua concentração no soro, através da fórmula:

***Clearance* da creatinina (mL/min) = ($U_{(mg/dL)}$ / $S_{(mg/dL)}$) x $V_{(mL/min)}$ x A.1,73**

U = concentração da creatinina na urina;

S = concentração da creatinina no soro;

V = volume de urina de 24 h

A = superfície corporal

Valores elevados de creatinina no soro originam valores diminuídos de c*learance* de creatinina. Uma diminuição da *clearance* da creatinina sugere lesão glomerular.

1.3.2. Pesquisa de gonodotrofina coriónica humana na urina

Resumo

A gonodotrofina coriónica humana (hCG) é segregada através dos tecidos da placenta durante a gravidez, sendo depois excretada na urina, aproximadamente 20 dias após o último período menstrual. Os níveis de hCG aumentam rapidamente, atingindo o seu máximo após 60-80 dias. Depois da conceção, o aparecimento de hCG na urina e o seu rápido aumento de concentração, torna este teste ideal para uma rápida deteção e confirmação da gravidez. No entanto, níveis elevados de hCG podem estar associados a neoplasmas trofoblásticos e não trofoblásticos e, portanto, estas condições devem ser consideradas, antes que um diagnóstico de gravidez seja feito. [23]

Princípio do ensaio

- Teste rápido, qualitativo, imunocromatográfico para a determinação da hormona hCG em amostras de soro ou urina humanas.

À medida que a amostra flui através da membrana o conjugado coloidal anti-hCG complexa com a hCG da amostra. Este complexo move-se para a região de teste (T), onde é imobilizado pelo anti-hCG monoclonal que reveste a membrana, provocando assim a formação de uma linha rosada que confirma um resultado positivo do teste. A ausência desta linha rosada na região T indica um resultado negativo. O conjugado que não reagiu e o complexo não ligado, se existirem, continuam a mover-se ao longo da membrana e são finalmente imobilizados por anticorpos anticamundongo na região de controlo (C) formando uma linha rosada. Esta linha de controlo serve para validar os resultados do teste. [23]

1.3.3. Urina tipo II

As tiras de teste para a urina permitem a determinação de vários constituintes indicativos de alterações renais, hepáticas e metabólicas.

A amostra utilizada é a primeira urina da manhã, colhida para um frasco esterilizado, após lavagem da zona genital e com desprezo do primeiro jato. As urinas são posteriormente vertidas para tubos cónicos etiquetados.

As determinações efetuadas na urina tipo II incluem o aspeto, cor, densidade, pH, proteínas, glicose, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio, nitritos, leucócitos e presença de sangue.

A urianálise é efetuada pelo autoanalisador URISYS 2400, da Roche, visualizado na figura 6.

Figura 6 – Sistema de urianálise URISYS 2400, da Roche, para a determinação da urina tipo II.

Princípio do ensaio

O URYSIS 2400 é um fotómetro de refletância totalmente automatizado que realiza determinações semiquantitativas a partir de tiras de teste de urina. [24] (Tabela 2)

Tabela 2 – Princípios reacionais que ocorrem na determinação dos diferentes parâmetros na urina, efetuados pelo analisador URYSIS 2400. [25]

pH	A zona de teste contém os indicadores de pH vermelho de metilo, fenolftaleína e azul de bromotimol e reage especificamente com os iões de H^+. Os valores de pH mais frequentes na urina de indivíduos saudáveis variam entre 5 e 6.
Leucócitos	O teste revela a presença de esterases granulocitárias. Estas esterases decompõem um éster indoxílico em indoxil, que reage com um sal de diazónio produzindo um corante violeta. A presença de bactérias, *Trichomonas* ou eritrócitos na urina não afeta a reação.
Nitritos	O teste é baseado no princípio da prova de Griess e é específico para nitritos. A reação revela a presença de nitritos e, indiretamente, de bactérias produtoras de nitritos na urina, através de uma coloração rosa-avermelhada na zona de teste.
Proteínas	O teste baseia-se no princípio do erro proteico de um indicador de pH. A reação é particularmente sensível à albumina. A quinina, quinidina, cloroquina, tolbutamida e um pH elevado (até pH 9) não afetam o teste.

Glicose	A determinação é baseada na reação específica da glicose-oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste é independente do pH e da densidade específica da urina e não é afetado pela presença de corpos cetónicos.
Corpos cetónicos	O teste baseia-se no princípio da prova de Legal. A sensibilidade para o ácido acetoacético é superior à da acetona.
Urobilinogénio	Um sal de diazónio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogénio, originando um corante azoico vermelho. O teste é específico para urobilonogénio e não está sujeito aos conhecidos fatores de interferência da prova de Ehrlich.
Bilirrubina	O teste baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazónio. Uma coloração ligeiramente cor-de-rosa já constitui um resultado positivo, ou seja, patológico. Outros constituintes da urina produzem uma coloração amarela de intensidade variável.
Sangue (eritrócitos/Hb)	A ação, semelhante à peroxidase, da hemoglobina e da mioglobina catalisa especificamente a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogénio orgânico contido na zona de teste, originando uma coloração azul-esverdeada.
Zona de compensação	Esta zona branca, que não contém reagentes, permite uma compensação, por parte do analisador, para a cor intrínseca da urina quando está a avaliar os parâmetros relativos aos leucócitos, nitritos, proteínas, glicose, corpos cetónicos, urobilinogénio e bilirrubina.

Interpretação dos resultados

➲ Aspeto

- Límpida;
- Turva - Presença de uratos, fosfatos, mucoproteínas, leucócitos, células epiteliais, bactérias e/ou cristais.

➲ Cor

- Amarelo (nas suas várias tonalidades);
- Verde - Infeção por *Pseudomonas*, amitriptilina, corantes;
- Castanha - Pigmentos biliares, fezes;
- Preta - Melanoma, alcaptonúria (ácido homogentísico), α-metildopa;
- Vermelha - Hematúria, rifampicina, beterraba.

➲ Densidade

- Normal - 1,014-1,025;
- A densidade usualmente diminui em alterações renais (pielonefrite, glomerulonefrite, diminuição da capacidade de concentração dos rins) e ingestão elevada de água;
- A densidade habitualmente aumenta em desidratação, proteinúria, diabetes *Mellitus* (glicosúria) e tumores secretores de ADH;

- Em poliúria a densidade normalmente baixa e em oligúria geralmente aumenta.

➲ pH

- O pH normal da urina varia entre 5.0-6.0;
- Uma dieta altamente proteica, desidratação, acidose metabólica e respiratória podem levar a urinas mais ácidas;
- As infeções por algumas bactérias, como o *Proteus,* alcalinizam a urina. Uma dieta altamente vegetariana, alcalose respiratória e metabólica, podem levar a urinas mais alcalinas.

➲ Proteínas

- Em condições normais, a membrana glomerular impede a passagem da maior parte das proteínas do sangue para a urina. Todavia, uma pequena quantidade é filtrada, e uma fração desta é reabsorvida pelos túbulos sendo a restante excretada. Essas quantidades normalmente não são detetadas pelos métodos de rotina;
- O aparecimento de elevada quantidade de proteínas na urina indica lesão renal.

➲ Glicose

- A glicose em condições normais não aparece na urina. Caso apareça indica alguma patologia. Na maioria dos casos a glicose aumentada na urina é consequência de hiperglicémia temporária, mas por vezes a sua presença na urina deve-se a defeitos tubulares. A glicosúria não tem sensibilidade para permitir a monitorização da diabetes, uma vez que o limite renal para a glicose é de 180 mg/dL, valor muito superior ao limite para o diagnóstico de diabetes *Mellitus*;
- Nas crianças, o teste não deteta a eliminação de outros açúcares como a galactose ou a frutose que pode estar elevada em perturbações congénitas do metabolismo. O ácido ascórbico dá resultados falsos negativos.

➲ Corpos cetónicos

- Os corpos cetónicos incluem o ácido β-hidroxibutírico, ácido acetoacético e a acetona que podem aparecer na urina em determinados estados fisiológicos e patológicos. Os corpos cetónicos são produtos derivados principalmente do metabolismo dos ácidos gordos (uma pequena quantidade deriva dos aminoácidos);
- A presença de corpos cetónicos na urina pode ocorrer em indivíduos em jejum prolongado, febre ou cetoacidose diabética.

➲ Nitritos

- A presença de nitritos na urina pode indicar infeção bacteriana (bacteriúria). Muitas bactérias, como por exemplo o *Proteus mirabilis,* produzem nitrato redutase, uma enzima que reduz nitratos a nitritos. No entanto, a ausência de nitritos não exclui a possibilidade de infeção bacteriana uma vez que existem bactérias que não produzem nitritos, como o *Enterococcus faecalis.*

➲ Urobilinogénio

- O aumento de urobilinogénio na urina pode ser devido a icterícia hemolítica, sobrecarga hepática e doenças hepáticas (hepatite vírica, cirrose hepática).

➲ Bilirrubina

- A presença de bilirrubina na urina está essencialmente relacionada com obstruções pós-hepáticas, que se traduzem num aumento da bilirrubina conjugada, a qual é solúvel, aparecendo, por isso, na urina.

➲ Sangue

Hematúria

- A hematúria pode ser dividida em macroscópica (urina vermelha ou avermelhada visível) e microscópica (urina com coloração normal, pois a quantidade de eritrócitos apenas é visível microscopicamente);
- O aumento dos eritrócitos na urina pode ocorrer em situações não patológicas tais como, prática de exercício físico intenso, contaminação menstrual, e em situações patológicas como, infeções do trato urinário, distúrbios na coagulação, tumores renais e litíase renal.

Hemoglobinúria

- A hemoglobinúria indica a presença de Hb livre na urina, o que sugere lise da membrana eritrocitária. A presença de Hb na urina pode ocorrer em anemias hemolíticas (o excesso de Hb livre pode ser filtrado pelo rim e eliminado na urina, conferindo-lhe uma cor vermelha).

1.3.4. Sedimento urinário

O exame microscópico do sedimento é um estudo importante para avaliar o estado funcional do rim.

Este exame implica a observação de eritrócitos, leucócitos, cilindros, cristais, células epiteliais de descamação, células epiteliais do trato urinário superior, granulações, filamentos de muco, células espermáticas e microrganismos (bactérias, leveduras e parasitas).

Interpretação dos resultados

➲ Eritrócitos

Podem aparecer na urina em situações de litíase renal, glomerulonefrites, tumores renais, tuberculose renal, entre outros.

➲ Leucócitos

Podem aparecer na urina em infeções urinárias, pielonefrites, glomerulonefrites agudas, entre outras situações.

➲ Células epiteliais do trato urinário inferior ou células de descamação

Não têm significado clínico atribuído. Têm morfologia poliédrica, núcleo central e pequeno. A relação núcleo/citoplasma é pequena.

➲ Células epiteliais do trato urinário superior

Sempre que estão presentes na urina têm significado clínico. A relação núcleo/citoplasma é grande.

➲ Cilindros

O principal componente dos cilindros é a proteína Tamm-Horsfall, a qual tem origem nas células tubulares renais. Os cilindros são formados por gelificação desta proteína.

Podem ser classificados em:

- Hialino – Podem não ter significado clínico (associados por exemplo a exercício físico intenso). Estão frequentemente presentes em glomerulonefrites e pielonefrites;
- Granulosos, que podem ser divididos em:
  - Cerosos - Patogonomónicos de insuficiência renal crónica;
  - Hemáticos - Contém eritrócitos no seu interior. Estão associados a glomerulonefrites;
  - Leucocitários – Contém leucócitos no seu interior. Estão associados a infeção renal (pielonefrite);
  - Gordurosos - Frequentemente associados a síndrome nefrótico;
  - Epiteliais - Frequentemente associados a lesões nefrotóxicas.

➲ Cristais

A presença de cristais na urina pode constituir uma evidência da formação de cálculos e da presença de doenças metabólicas. Os cristais dependem do pH urinário.

Na urina ácida os cristais que mais vulgarmente aparecem são:

- Cristais de ácido úrico;
- Cristais de oxalato de cálcio;
- Cristais de cistina.

Na urina alcalina os cristais que aparecem com maior frequência são:

- Cristais de fosfato triplo de amónio e magnésio.

➲ Granulações

A presença de granulações depende da temperatura e do pH da urina. A diminuição da temperatura favorece a formação de granulações.

- Granulações de uratos amorfos (urina ácida);
- Granulações de fosfatos amorfos (urina alcalina).

1.4. Fezes

1.4.1. Pesquisa de sangue oculto

Resumo

Neste laboratório a pesquisa de sangue oculto nas fezes é efetuada utilizando um teste rápido imunocromatográfico para a deteção qualitativa de Hb humana em amostras de fezes. Permite detetar indícios de distúrbios gastrointestinais como o cancro ou hemorroidas graves. Este é um teste com elevada especificidade e sensibilidade. [26]

Princípio do teste

Baseia-se numa reação de anticorpos específicos que detetam a Hb. Quando a amostra de fezes contém Hb, esta reage com anticorpos monoclonais específicos que estão vinculados a partículas de ouro. Este complexo migra pela membrana e alcança a linha de teste (T), que está pré-revestida por anticorpos anti-Hb (origina uma banda rosa nesta região). Como indicador de bom desempenho do teste aparecerá sempre uma banda colorida na região controlo (C). [26]

1.5. Análises executadas em laboratório externo

Existem algumas determinações que não são executadas neste laboratório como a eletroforese de Hb, vitamina D3 e vitamina C, sendo enviadas para um laboratório externo. As amostras são congeladas até ao seu envio para o laboratório externo, envio esse que se realiza normalmente duas vezes por semana.

O transporte das amostras das unidades de colheita para o laboratório central e deste para os laboratórios externos é feito em malas térmicas refrigeradas, por pessoal e transporte afetos ao laboratório central.

2 – SEROLOGIA

As análises serológicas são realizadas manualmente utilizando amostras de soro. Neste capítulo irei abordar as análises serológicas que executei ao longo deste estágio [*Veneral Disease Reference Laboratory* (VDRL), *Treponema pallidum haemagglutination* (TPHA), pesquisa de CRP, pesquisa de fator reumatoide, reação de Waaler Rose, reação de Paul-Bunnel, reação de Wright, reação de Widal e reação de Weil Félix], o princípio de cada ensaio, bem como a interpretação dos resultados.

A maior parte das análises serológicas são executadas de acordo com a figura 7.

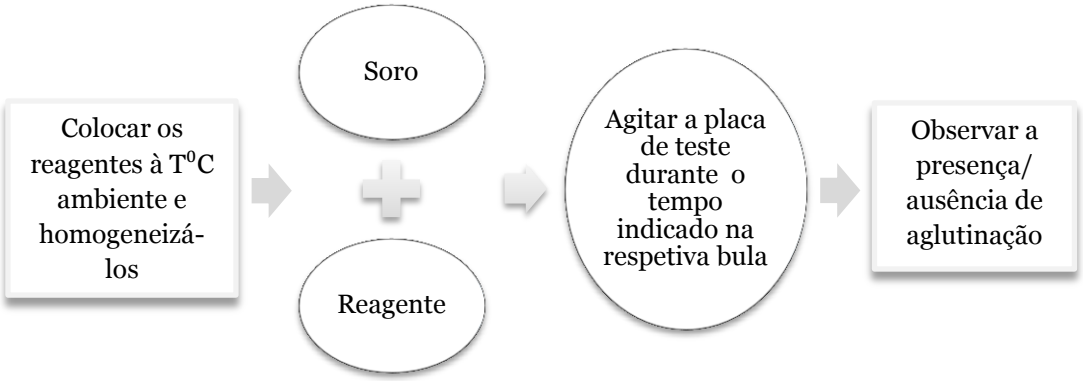

Colocar os reagentes à T^{0}C ambiente e homogeneizá-los
Soro
Reagente
Agitar a placa de teste durante o tempo indicado na respetiva bula
Observar a presença/ ausência de aglutinação

Figura 7 – Representação esquemática dos procedimentos serológicos (excetuando o do TPHA).

2.1. VDRL (*Veneral Diseases Reference Laboratory*) e TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*)

Resumo

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, sendo o *Treponema pallidum* o seu agente causador. [27]

A transmissão da sífilis ocorre, principalmente, por via sexual (sífilis adquirida) e vertical, pela placenta da mãe para o feto (sífilis congénita). [27]

Esta doença pode ser diagnosticada por testes serológicos que visam detetar a presença de anticorpos dirigidos contra o *Treponema Pallidum*. Este agente promove o desenvolvimento de dois tipos de anticorpos: as reaginas [anticorpos inespecíficos IgM e IgG contra a cardiolipina (presente na parede do *Treponema pallidum*)] que são detetadas por testes não treponémico como o VDRL, e anticorpos específicos contra o *Treponema pallidum*, detetados através de testes treponémicos como o TPHA. [27]

2.1.1. VDRL (*Veneral Diseases Reference Laboratory*)

O VDRL é um teste de floculação não específico utilizado para a pesquisa de anticorpos associados à infeção por *Treponema pallidum*.

Princípio do teste

Quando ocorre a ligação entre o colesterol/cardiolipina/lectina do reagente e os anticorpos reagina da amostra, forma-se um complexo antigénio-anticorpo, traduzido pela presença de manchas pretas. [28] (Figura 8)

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação: Não reativo
- Presença de aglutinação: Reativo

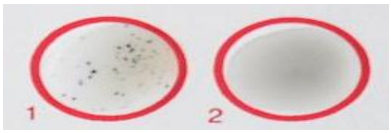


Figura 8 – Imagem relativa ao resultado do teste VDRL (1-reativo; 2-não reativo).

Sempre que se formam aglutinados procede-se ao ensaio semiquantitativo [2]. Neste ensaio efetuam-se diluições sucessivas da amostra em soro fisiológico (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc). Cada uma das diluições é misturada com o regente nas cavidades da placa de teste. O resultado é o correspondente à última diluição onde ocorreu aglutinação.

O teste VDRL não é específico, por isso podem surgir resultados positivos noutro tipo de situações que não da sífilis (reações falsas positivas), como nas doenças autoimunes. Assim sendo, as amostras positivas por este método devem ser analisadas pelo teste TPHA, de modo a ser confirmada a infeção por *Treponema pallidum*.

2.1.2. TPHA (*Treponema pallidum haemagglutination*)

O TPHA é um teste específico de hemaglutinação para a deteção de anticorpos anti-*Treponema pallidum* no soro ou LCR do doente.

Princípio do teste

Este teste é constituído por eritrócitos de aves sensibilizados com antigénios tratados com formol, um controlo com eritrócitos de aves (não sensibilizados), diluente e um soro controlo.

Quando as amostras positivas diluídas são misturadas com os eritrócitos sensibilizados, os anticorpos reagem com os antigénios do eritrócito sensibilizado provocando a aglutinação das células. As células formam um padrão característico no fundo do poço da placa de microtitulação. Na ausência de anticorpos na amostra forma-se um botão compacto no fundo do poço. [29] (Figura 9)

[2] O ensaio semi-quantitativo, descrito anteriormente, é realizado igualmente para outras reações serológicas, sempre que estas apresentam um resultado positivo, tais como a pesquisa de fator reumatoide, reação de Waaler Rose e reação de Wright.

Figura 9 – Imagem relativa a um possível resultado do teste TPHA (nos dois poços à esquerda o resultado é positivo e nos dois à direita é negativo).

2.2. Pesquisa de Proteína c reativa

Resumo

A pesquisa de CRP é feita utilizando um teste rápido de aglutinação para a sua deteção no soro humano. Esta é uma proteína de fase aguda sintetizada no fígado em resposta à libertação de citocinas inflamatórias e, portanto, está associada a infeções agudas, situações necróticas e a uma grande variedade de estados inflamatórios. A monitorização dos níveis de CRP permite avaliar a eficácia do tratamento e recuperação do doente. [30]

Princípio do teste

As partículas de látex do reagente são revestidas com anticorpos humanos anti-CRP. Quando se mistura a suspensão de látex com um soro que contenha níveis elevados de CRP a reação imunológica origina uma aglutinação nítida. [30] (Figura 10)

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação: Resultado negativo
- Presença de aglutinação: Resultado positivo

Figura 10 – Resultado positivo (à esquerda) e negativo (à direita) relativo à pesquisa de CRP.

A CRP também é doseada no soro pelo autoanalisador Olympus AU600. Este aparelho utiliza uma técnica imunoturbidimétrica para esta determinação. A CRP reage especificamente com anticorpos anti-CRP formando agredados antigénio-anticorpo, cuja absorvância é proporcional à concentração de CRP na amostra. Este é um método mais sensível (menor limite de deteção) quando comparado com a pesquisa serológica de CRP, referida anteriormente.

2.3. Pesquisa de Fator Reumatoide

Resumo

A pesquisa de fator reumatoide em soro humano executa-se usando um teste rápido de aglutinação.

O fator reumatoide está presente no soro de doentes com artrite reumatoide e acredita-se que é constituído por anticorpos IgM dirigidos contra as imunoglobulinas do doente. [31]

Princípio do ensaio

As partículas de látex do reagente são revestidas com gama globulina humana altamente purificada. Quando a suspensão de látex é misturada com o soro contendo elevados níveis de fator reumatoide, observa-se aglutinação. [31]

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação: resultado negativo
- Presença de aglutinação: resultado positivo

No caso de o resultado ser positivo deve-se efetuar o ensaio semiquantitativo.

2.4. Reação de Waaler Rose

Resumo

A reação de Waaler Rose baseia-se num teste rápido de hemaglutinação para a deteção de fator reumatoide (anticorpos do tipo IgM direcionados contra as imunoglobulinas do tipo G do próprio doente) no soro humano. [32]

Princípio do teste

O reagente é constituído por uma suspensão de eritrócitos de ovelha marcados com IgG de coelho antiovelha. Quando o fator reumatoide está presente na amostra de soro verifica-se hemaglutinação. [32]

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação: Resultado negativo
- Presença de aglutinação: Resultado positivo

Se o resultado for positivo realiza-se o ensaio semiquantitativo.

2.5. Reação de Paul-Bunnel

Resumo

A reação de Paul-Bunnel efetua-se através de um teste de aglutinação em látex para a deteção e semiquantificação de anticorpos heterófilos associados à mononucleose infeciosa. A mononucleose infeciosa envolve o tecido reticuloendotelial e é provocada pelo vírus *Epstein Barr*. [33]

Princípio do ensaio

Este teste é baseado na reação entre os anticorpos heterófilos contra o vírus *Epstein Barr* presentes no soro do doente e o reagente que contém eritrócitos de bovino,

sensibilizados com o antigénio da mononucleose, ocorrendo assim uma reação imunológica, que é observada pela formação de aglutinados. (33)

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação – resultado negativo
- Presença de aglutinação – resultado positivo

2.6. Reação de Wright

Resumo

Este teste auxilia no diagnóstico *in vitro* de anticorpos produzidos contra a *Brucella abortus*. Esta é uma bactéria encontrada principalmente no gado bovino, causando anomalias no desenvolvimento e viabilidade fetal. Apresenta uma transmissão zoonótica, através da ingestão de leite e queijo não pasteurizado e carne provenientes de animais infetados, contacto com animais contaminados (fetos abortados, restos placentários), levando a uma patologia designada por brucelose. Os sintomas agudos incluem geralmente febre, arrepios, sudorese, cefaleias, artralgias, perda de peso e mal-estar generalizado. (34)

Princípio do teste

O resultado deste teste depende da capacidade dos anticorpos presentes no soro do doente para aglutinar com os antigénios bacterianos existentes no reagente. Quando a concentração e a capacidade são elevadas os agregados formados tornam-se visíveis a olho nú. (35)

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação - Resultado negativo
- Presença de aglutinação - Resultado positivo

No caso de o resultado ser positivo efetua-se o ensaio semiquantitativo.

2.7. Reação de Widal

Resumo

Este teste ajuda no diagnóstico *in vitro* de anticorpos produzidos contra *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*, pelo método de aglutinação. (35)

Patologias como a febre tifoide e a febre paratifoide estão associadas à infeção por *Samonellas*. A febre tifoide apresenta sintomatologia grave com septicemia, febre elevada, diarreia e vómitos. O único reservatório é o Homem, por isso a transmissão é interpessoal, através de água e alimentos contaminados. Na febre paratifoide os sintomas clínicos são

mais ligeiros desenvolvendo frequentemente um quadro de gastroenterite, febre, podendo evolui para septicemia. [36]

O diagnóstico laboratorial de febre tifoide (*S. typhi*) e paratifoide (*S. paratyphi* A,B,C,D) é feito frequentemente pela reação de Widal, a qual quantifica os anticorpos anti-O e anti-H, presentes no soro do doente, por reação de aglutinação com suspensões antigénicas de *Salmonella* (AO, AH, BO, BH, CO, CH e TO, TH). [1]

Princípio do teste

O resultado do teste depende da capacidade dos anticorpos existentes no soro do doente para aglutinar os antigénios bacterianos. Quando a concentração e a capacidade são elevadas formam-se agregados visíveis. [35] (Figura 11)

Antigénios utilizados: *Salmonella typhi* antigénio H; *Salmonella typhi* antigénio O; *Salmonella paratyphi* grupo A antigénio H; *Salmonella paratyphi* grupo B antigénio H

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação – resultado negativo (<1:20)
- Presença de aglutinação – resultado positivo

Figura 11 - Possíveis resultados da reação de Widal, utilizando os antigénios *Salmonella typhi* antigénio H; *Salmonella typhi* antigénio O; *Salmonella paratyphi* grupo A antigénio H; *Salmonella paratyphi* grupo B antigénio H (da esquerda para a direita, respetivamente) e com reação negativa nas cavidades 6, 7 e 8 e positiva na cavidade 9).

No caso de ocorrer aglutinação procede-se ao ensaio semiquantitativo, que neste caso é realizado misturando quantidades sucessivamente menores da amostra com uma gota de reagente, de modo a observar a presença/ausência de aglutinação. O resultado corresponde à última diluição onde ocorreu aglutinação.

2.8. Reação de Weil Félix

Resumo

A reação de Weil-Felix utiliza suspensões de antigénios para a deteção de anticorpos anti-*Rickettsias*. [35]

As *Rickettsias* são bactérias transportadas e transmitidas ao Homem por parasitas como as pulgas, piolhos, carraças e ácaros. São microrganismos intracelulares, multiplicando-se nas células endoteliais dos vasos periféricos. Uma infeção por *rickettsias* origina frequentemente febre, erupção cutânea e artralgias. O diagnóstico pode ser feito pela pesquisa de anticorpos contra estes microrganismos no soro do paciente. [37]

Princípio do teste

O resultado deste teste depende da aglutinação entre as suspensões bactericidas inativadas existentes nos reagentes e os anticorpos presentes no soro do doente. No caso de ocorrer reação imunológica observam-se agregados. [35] (Figura 12)

Antigénios usados: *Proteus* OX19**;** *Proteus* OX2**;** *Proteus* OXK

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação – resultado negativo (<1:20)
- Presença de aglutinação – resultado positivo

Figura 12 - Possível resultado da reação de Weil-Félix, utilizando os antigénios *Proteus* OX19; *Proteus* OX2; *Proteus* OXK (da esquerda para a direita, respetivamente). Nas cavidades à esquerda e ao centro – resultado positivo e na cavidade à direita – resultado positivo.

Se a reação for positiva executa-se o ensaio semiquantitativo, tal como está descrito na reação de Widal.

As análises serológicas efetuadas com maior frequência neste laboratório são o teste VDRL, a pesquisa de CRP e a determinação do fator reumatoide. Os restantes ensaios são solicitados com menos assiduidade.

O ensaio VDRL foi, sem dúvida, o que executei em maior quantidade, o que se deve ao facto deste ser um ensaio realizado em mulheres grávidas, em indivíduos que pretendem doar esperma ou óvulos (centro de reprodução medicamente assistida), para além de outros indivíduos com suspeita de sífilis.

3 – MICROBIOLOGIA

O setor de microbiologia recebe diversos produtos biológicos. Durante a minha permanência nesta valência foi solicitada a análise microbiológica de urina (o mais frequente), fezes, exsudado vagino-retal, exsudado vaginal, exsudado uretral, exsudado purulento, exsudado auricular e expetoração, os quais serão aportados neste capítulo.

3.1. Meios de Cultura

Para a realização das análises microbiológicas são usados vários meios de cultura, que são selecionados tendo em consideração a amostra a ser processada e os agentes patogénicos passíveis de serem encontrados na mesma.

Na tabela seguinte estão descritos os meios de cultura utilizados neste laboratório. (Tabela 3)

Tabela 3 - Meios utilizados para a pesquisa de microrganismos em diversas amostras biológicas.

Meios de cultura	Finalidade	Princípio
Gelose CLED-D (*Cystine Lactose Electrolyte Deficient*)	Meio recomendado para o isolamento dos microrganismos urinários	É um meio diferencial permitindo distinguir os microrganismos que fermentam a lactose dos que não fermentam. Os microrganismos fermentadores da lactose originam colónias amarelas e amarelas-esverdeadas por acidificação do meio. Os que não fermentam originam colónias esverdeadas, azuis ou incolores. A deficiência em eletrólitos neste meio inibe o "swarming" do *Proteus*. (38)
Gelose Manitol Salt Agar (MSA)	Meio que se destina ao isolamento e à diferenciação dos *Staphylococcus*.	Os microrganismos que fermentam o manitol originam colónias amarelas, por acidificação do meio. Esta característica é um critério de orientação presuntiva para a identificação de *Staphylococcus aureus*. O elevado teor em NaCl limita o crescimento de outros microrganismos que não os *Stahylococcus*. (39)
Gelose Bilis-Esculina- Azida	Destina-se ao isolamento seletivo e à identificação de *Enterococcus* e *Streptococcus* do grupo D a partir de colheitas polimicrobianas.	A hidrólise da esculina pelos *Enterococcus* provoca o aparecimento de um halo negro à volta das colónias. A seletividade do meio em relação às bactérias de Gram (-) é assegurada pela azida sódica. A bílis inibe algumas bactérias de Gram (+), excetuando os *Enterococcus*. (40)

Gelose SS	Meio usado para o isolamento seletivo e diferencial das espécies de *Salmonella* e *Shigella* a partir de amostras de fezes.	O meio permite evidenciar colónias que fermentam a lactose e reduzem o tiosulfato (produção de H_2S). Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosa e os que não fermentam originam colónias incolores. Aqueles que produzem H_2S originam colónias com centro negro. A presença de colónias incolores ou ligeiramente coloridas com ou sem centro negro representam uma forte presunção de *Salmonella* ou *Shigella*, respetivamente. A mistura de sais biliares e de corantes presentes no meio inibe as bactérias de Gram (+). (41)
Gelose XLD-D	Meio de isolamento seletivo e diferencial destinado à pesquisa de espécies de *Salmonella* e *Shigella* em amostras de fezes.	Os microrganismos que possuem descarboxílase originam colónias vermelhas por descarboxilação da lisina. As bactérias que produzem H_2S originam colónias com centro negro. As espécies que fermentam um dos três açúcares contidos no meio originam colónias amarelas ou laranja. A presença de colónias rosa ou vermelhas com ou sem centro negro (colónias características) representa uma forte presunção de *Salmonella* ou de *Shigella*, respetivamente. A inibição das bactérias de Gram (+) é conseguida pela presença do desoxicolato de sódio. (42)
Gelose de Sabouraud Cloranfenicol 2	Meio recomendado para o isolamento seletivo de leveduras e fungos filamentosos a partir de amostras polimocrobianas.	A presença de peptonas e glicose favorece o desenvolvimento das estirpes fúngicas. O pH da gelose, ligeiramente ácido, favorece o crescimento de fungos em relação ao desenvolvimento bacteriano. A seletividade do meio em relação à maioria das bactérias é assegurada pelo cloranfenicol. (43)
Meio de enriquecimento de tetrationato	Meio de enriquecimento utilizado para amostras de fezes	É utilizado no exame bacteriológico de fezes com o objetivo de inibir o crescimento da flora intestinal normal, de modo a evidenciar o crescimento das bactérias patogénicas.
Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro (GS)	Meio destinado ao isolamento de microrganismos exigentes em diversas amostras.	Esta gelose contém uma mistura de peptonas particularmente adaptada à cultura de microrganismos exigentes (*Streptococcus*, *Listeria*, etc). A presença de sangue de carneiro permite a expressão da hemólise que orienta a

		identificação bacteriana. Esta gelose também é adaptada para o isolamento de microrganismos anaeróbios (incubação em anaerobiose-5% de CO_2).[44]
Gelose de Chocolate PolyVitex (GC)	Meio que se destina ao crescimento de bactérias exigentes nutricionalmente, como a *Neisseria*, o *Haemophylus* e o *Streptococcus pneumoniae.*	Este meio é composto por uma base nutritiva enriquecida com os fatores X (hemina) e V (NAD) fornecidos pela Hb e pelo PoliVitex. [45]
Gelose MacConkey	Meio seletivo e diferencial para o isolamento de *Enterobacteriaceae*, a partir de colheitas de origens diversas	A gelose MacConkey com cristal de violeta permite evidenciar a fermentação da lactose pela viragem do indicador de pH vermelho neutro. Os microrganismos que fermentam a lactose originam colónias rosas ou vermelhas, por vezes contornadas por um halo de sais biliares. Os que não fermentam a lactose originam colónias incolores ou bege. A seletividade em relação às bactérias de Gram (+) é proporcionada pelos sais biliares e pelo cristal de violeta. [46]
Gelose Strepto B ID (STRB)	Meio cromogénico seletivo para a deteção de *Streptococcus* do grupo B (*S. agalactiae*) em mulheres grávidas e recém-nascidos a partir de amostras de origem clínica	A gelose Strepto B é constituída por uma base nutritiva que associa diferentes peptonas, três substratos cromogénicos e antibióticos. Estes componentes permitem detetar o *S. agalactiae* através do aparecimento espontâneo de colónias rosa pálido a vermelho. A maioria das outras espécies bacterianas e leveduras não se desenvolvem neste meio ou não formam colónias características. [47]
Meio de Todd Hewitt + antibióticos	Meio de enriquecimento para a deteção de *S. agalactiae* na mulher grávida.	A sua composição favorece o crescimento dos *Streptococcus* numa amostra polimicrobiana. Os antibióticos presentes no meio (ácido nalidíxico e colistina) inibem a maioria das bactérias de Gram (-) da flora comensal. Após a etapa de enriquecimento, este meio deve ser semeado em meios destinados à deteção do *S. agalactiae*. [48]
Meio de Lowenstein Jensen	Meio destinado à cultura das micobactérias.	Este meio, enriquecido com a presença de ovo, de asparagina e de fécula, favorece o crescimento do *Micobacterium tuberculosis* e de outras micobactérias. [49]

Gelose Muller Hinton	Meio que se destina ao estudo da suscetibilidade aos antibióticos e sulfamidas.	Permite o crescimento de bactérias não exigentes (*Enterobacteriaceae*, bacilos de Gram (-) não fermentadores, *Staphylococcus* e *Enterococcus*). A sua concentração em iões bivalentes é ajustada de modo a assegurar uma melhor precisão para determinar a sensibilidade das *Pseudomonas* aos aminoglicosídios, colistina e tetraciclinas. O seu baixo teor em timina-timidina (inibidores da atividade das sulfamidas) diminui os fenómenos de crescimento à volta destes discos e permite uma determinação precisa dos diâmetros de inibição. [50]
Gelose *Gardnerella*	Meio de isolamento seletivo destinado à deteção de *Gardnerella vaginalis* a partir de amostras genitais.	A presença de sangue humano facilita o crescimento da espécie procurada e permite a obtenção de uma β hemólise à volta das colónias. Os antibióticos presentes no meio inibem a maioria dos contaminantes Gram (-), bem como das leveduras. [51]

Os meios de Gelose CLED-D, Gelose SS, Gelose XLD-D, Gelose Bilis-Esculina-Azida, Gelose de Manitol Salt Agar, Gelose de Sabouraud Cloranfenicol 2, Gelose MacConkey, meio de enriquecimento de tetrationato e Gelose Muller Hinton são preparados no laboratório, enquanto os restantes são adquiridos prontos.

3.2. Galerias de identificação e galerias de antibiogramas

Neste laboratório são utilizadas algumas galerias de identificação, que permitem uma identificação automática das diversas bactérias, efetuada pelo aparelho mini API ®, da bioMérieux.

As galerias de identificação usadas são o ID32 E (08) [52], o ID32 E RAPID (08) e o ID32 E STAPH (08), da bioMérieux. [53] (Figura 13)

ID32 E (08)	Sistema de identificação para *Enterobacteriaceae* e outros bacilos de Gram (-) não fastidiosos.
ID32 E RAPID (08)	O ID32 E RAPID (08) é um sistema de identificação semelhante ao ID32 E (08). Entre os dois varia o tempo de incubação necessário para a leitura, que no primeiro é de apenas 4 h, enquanto que no segundo são necessárias 18 a 24 h de incubação.
ID32 E STAPH (08)	Sistema padronizado para a identificação dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e outros géneros semelhantes, *Rothia* e *Aerococcus*.

Figura 13 – Descrição das galerias de identificação bacteriana ID32 E (08), ID32 E RAPID (08) e ID32 E STAPH (08).

Para além de galerias de identificação, o laboratório também dispõem de galerias de antibiogramas (ATB), o ATB™ UR EU (08) [54], ATB™ PSE EU (08) [55] e o ATB™ STAPH EU (08) [56], da bioMérieux, que permitem classificar as bactérias como sensíveis, intermédias ou resistentes, no que respeita à sua suscetibilidade aos antibióticos testados. (Figura 14)

ATB ™ UR (08)	Permite determinar a sensibilidade das *Enterobacteriaceae* de origem urinária aos antibióticos, em meio semi-sólido, em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de micro-diluição.
ATB ™ STAPH EU (08)	Esta galeria permite determinar a sensibilidade dos *Staphylococcus* aos antibióticos, em meio semi-sólido, em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de microdiluição.
ATB ™ PSE EU (08)	Esta galeria permite determinar a sensibilidade das *Pseudomonas* e de outros bacilos de Gram (-) não fermentadores aos antibióticos, em meio semi-sólido, em condições muito próximas das técnicas de referência de diluição em gelose ou de microdiluição.

Figura 14 - Descrição das galerias de antibiogramas ATB™ UR EU (08), ATB™ STAPH EU (08) e ATB™ PSE EU (08).

Como já foi referido, quer as galerias de identificação quer as de ATB são automaticamente lidas pelo aparelho mini API®, da bioMérieux. (Figura 15)

Figura 15 – Aparelho mini API®, da bioMérieux.

Este aparelho satisfaz dois tipos de leitura, turbidinefelométrica e colorimétrica.

A turbidinefelometria inclui a turbidimetria (medida da intensidade da luz transmitida, inversamente proporcional ao crescimento bacteriano) e a neflometria (medida da intensidade da luz difusa a 30^0 diretamente proporcional ao crescimento bacteriano). Estas duas medidas permitem avaliar a densidade bacteriana em cada cúpula.

Ex. ATB UR– leitura tubidineflometrica

A colorimetria efetua para cada cúpula uma medida de transmissão da luz em 4 regiões do espetro visível.

Ex. ID32 E, ID32 E RAPID, ID32 E STAPH – leitura colorimétrica. [57]

3.3. Condições de assepsia

A preparação dos meios de cultura, bem como o manuseamento e inoculação dos produtos microbiológicos nos respetivos meios são efetuados em condições asséticas, asseguradas pelo uso de bico de Bunsen, de modo a evitar qualquer tipo de contaminação. Todo o material utilizado é mantido em condições estéreis.

3.4. Provas complementares de identificação

3.4.1. Coloração de Gram

A coloração de Gram permite dividir as bactérias em dois grupos: Gram (+) e Gram (-).

O diferente comportamento das bactérias em relação à coloração de Gram está relacionado com o facto destes dois grupos apresentarem uma parede celular estruturalmente distinta. A parede celular das bactérias de Gram (+) não apresenta lípidos e contém elevada quantidade de peptidoglicano, enquanto a das bactérias de Gram (-) contém elevado teor lipídico e pouca quantidade de peptidoglicano. [58]

Nesta coloração, o corante primário (cristal de violeta) é retido pelos dois grupos bacterianos. O mordente (solução de lugol) reforça a ligação do corante primário às células. Quando se aplica a solução descorante (álcool a 96%) esta decora as bactérias de Gram (-), por dissolução dos lípidos da parede. Porém, não consegue remover o corante primário retido pelas bactérias de Gram (+). Quando se aplica o corante secundário (safranina) coram-se as bactérias de Gram (-). Assim sendo, as bactérias de Gram (+), que retiveram o corante primário, coram de roxo, enquanto as de Gram (-), que retiverem o corante secundário, coram de rosa. [58]

3.4.2. Coloração de Ziehl-Neelsen

Esta coloração é baseada no facto das Micobactérias apresentarem uma parede rica em lípidos, nomeadamente ácidos micólicos com cadeias longas e ramificadas, que lhes conferem resistência à coloração/descoloração por soluções álcool-ácido. Estas bactérias são, por isso, designadas por bactérias álcool-ácido resistentes.

Nesta coloração adiciona-se o corante primário que cora todas as bactérias existentes na preparação. Posteriormente adiciona-se uma solução álcool-ácida que descora todas as bactérias, excetuando as micobactérias, não adquirindo estas a coloração do segundo corante adicionado.

3.4.3. Prova da oxidase

Este teste baseia-se na capacidade de certas bactérias produzirem a enzima citocromo c oxidase. Na presença de oxigénio na atmosfera e de citocromo c, esta enzima oxida o reagente fenilenodiamina para formar um composto violeta, o indofenol. O ácido

ascórbico, incorporado no reagente, age enquanto agente redutor para limitar a auto-oxidação e melhorar a estabilidade do reagente. [59]

Procedimento

1. Colocar uma colónia pura da bactéria a testar num disco de papel de filtro;
2. Adicionar uma gota do reagente de oxidase;
3. A mudança de cor para violeta indica um resultado positivo.

Podemos fazer o despiste das bactérias que utilizam o metabolismo oxidativo, como a maioria das bactérias pertencentes aos géneros *Pseudomonas spp.* e *Neisseria spp.*, procedendo ao teste da oxidase.

3.4.4. Prova da catalase

Muitas bactérias durante o seu metabolismo produzem H_2O_2 e outros radicais livres, nocivos para a integridade celular. Existem bactérias que produzem as enzimas superóxido dismutase e catalase, que destroem estes radicais. A catalase decompõe o H_2O_2 em água e oxigénio. [58]

Esta prova é usualmente realizada para diferenciar *Staphylococcus,* que são catalase positivos d*e Streptococcus*, catalase negativos.

Procedimento

1. Com a ansa bacteriológica colher uma colónia suspeita e esfregar numa lâmina de vidro.
2. Colocar uma gota de H_2O_2 e observar a libertação de O_2, pela formação de bolhas.

O teste mais importante na identificação da família *Micrococcaceae* (géneros *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*) é o da catalase.

O género *Staphylococcus* pode ser dividido em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos, de acordo com a resposta à prova da coagulase.

3.4.5. Prova da coagulase

A prova da coagulase permite verificar a capacidade das bactérias para formar um coágulo ao reagirem com o plasma. A coagulase é uma proteína capaz de converter o fibrinogénio em fibrina, resultando na formação de um coágulo visível. A formação do coágulo de fibrina protege a bactéria da fagocitose. [58]

Esta prova é útil para diferenciar algumas espécies de *Staphylococcus* com importância clínica: coagulase positiva - *S. aureus*.

Procedimento

1. Mergulhar uma colónia suspeita em plasma humano, e uma colónia de *S. aureus* noutro tubo com o mesmo plasma (controlo positivo).
2. Incubar a 37^0 C durante 4 h.
3. A formação do coágulo é observada pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90^0 da vertical.
4. Na ausência de coágulo o tubo é reincubado a 37^0 C durante 24 h.

3.4.6. Prova da filamentação

A prova da filamentação permite fazer uma identificação presuntiva de *Candida albicans*.

Procedimento

1. Fazer uma suspensão de colónias da levedura em soro humano.
2. Incubar a 37^0 C até às 4 h.
3. Observar ao microscópio a formação de tubos de filamentação que indicam que a levedura é a *Candida albicans*.

No caso de a prova de filamentação ser negativa significa que não estamos perante *Candida albicans*. Porém se o crescimento em Gelose de Sabouraud Cloranfenicol2 for característico de *Candida*, o resultado é dado como *Candida spp*.

Os diferentes produtos biológicos analisados durante este estágio no setor de microbiologia serão apresentados de seguida.

3.5. Urina

3.5.1. Exame microbiológico da urina

Em pessoas saudáveis, o trato urinário acima da uretra é estéril, por isso a urina em condições normais é um líquido biológico estéril. Todavia, a sua passagem através da uretra durante a micção arrasta os microrganismos que a colonizam, podendo induzir erros na interpretação da urocultura. (60)

Do ponto de vista clínico, a infeção do trato urinário (ITU) pode ser dividida em dois grupos: ITU inferior, onde a presença de bactérias se restringe à bexiga (cistite), e ITU superior (pielonefrite), que está associada a alterações no parênquima renal. (61, 62)

A infeção urinária aguda é geralmente causada por bactérias da flora intestinal saprófita, que invadem o aparelho urinário por via ascendente através da uretra. (60) O gênero feminino apresenta maior prevalência de infeções urinárias, dada a menor extensão anatómica da uretra feminina e a proximidade entre a vagina e o ânus. (62)

As bactérias que mais frequentemente causam infeções urinárias pertencem ao género *Enterobacteriaceae* (*E. Coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.)*, outros bacilos de Gram (-) (*Pseudomonas aeruginosa*), cocos de Gram (+) como o *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e o *Enterococcus faecalis*, entre outras. Relativamente aos fungos, a Candida spp. é um dos fungos com maior destaque neste tipo de infeções. [62, 63] Neste laboratório o exame bacteriológico de urina é efetuado de acordo com a figura 16.

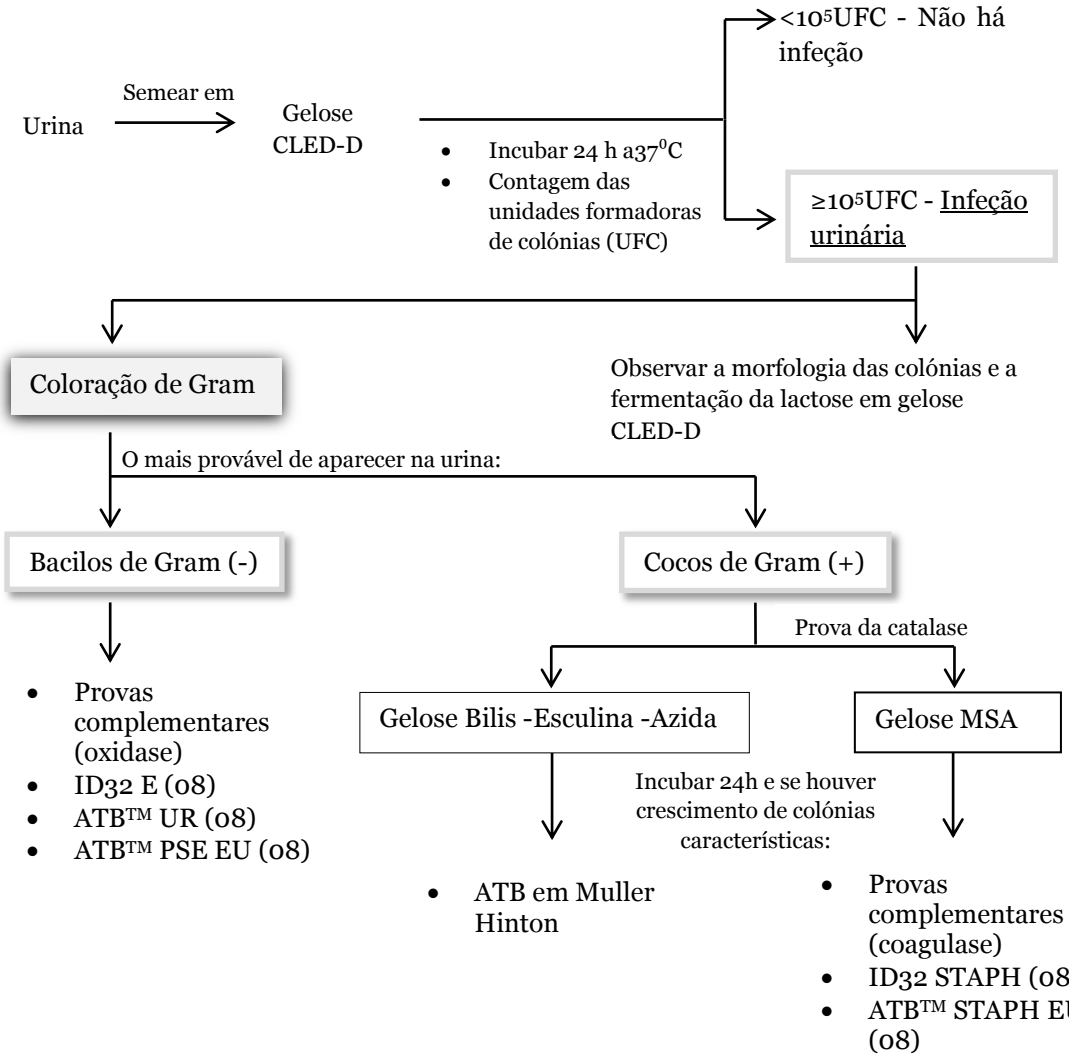

Urina
Semear em
Gelose CLED-D
• Incubar 24 h a37⁰C
• Contagem das unidades formadoras de colónias (UFC)
<10⁵UFC - Não há infeção
≥10⁵UFC - Infeção urinária
Coloração de Gram
Observar a morfologia das colónias e a fermentação da lactose em gelose CLED-D
O mais provável de aparecer na urina:
Bacilos de Gram (-)
Cocos de Gram (+)
Prova da catalase
• Provas complementares (oxidase)
• ID32 E (08)
• ATB™ UR (08)
• ATB™ PSE EU (08)
Gelose Bilis -Esculina -Azida
Gelose MSA
Incubar 24h e se houver crescimento de colónias características:
• ATB em Muller Hinton
• Provas complementares (coagulase)
• ID32 STAPH (08)
• ATB™ STAPH EU (08)

Figura 16 - Representação esquemática do processamento de amostras de urina para análise bacteriológica.

3.5.2. Pesquisa de *Chlamydia* na urina masculina

Resumo

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível. No seu ciclo de crescimento alterna dois tipos de formações, estrutural e funcionalmente distintas: os corpos elementares (forma de resistência e propagação) e os corpos reticulares (forma de multiplicação). [64]

Esta bactéria leva a complicações frequentes em mulheres e recém-nascidos. As complicações em mulheres incluem, cervicites, uretrites, endometrites, doença pélvica inflamatória, alta incidência de gravidez ectópica e infertilidade. A transmissão vertical da doença durante o parto da mãe para o recém-nascido pode resultar em conjuntivites e pneumonia. Nos homens as complicações desta infeção incluem uretrites e epididimites. (64)

Princípio

- Teste rápido imunocromatográfico para a deteção qualitativa de antigénio *Chlamydia* em amostras de urina masculina.

A *Chlamydia* é uma bactéria intracelular obrigatória, por isso, este teste inicia-se com uma centrifugação e lavagem da urina a 3000 rpm durante 15 min, que permite concentrar as células no sedimento. O sobrenadante é rejeitado e o teste é efetuado a partir do sedimento urinário. Este é misturado com reagentes fornecidos pelo kit, que promovem a extração do antigénio. A solução é colocada na placa de teste que apresenta anticorpos específicos do antigénio *Chlamydia* na região de teste (T). Se na solução existir antigénio *Chlamydia* este vai reagir com os anticorpos anti-*Chlamydia* originando uma linha colorida na região T. A ausência desta linha indica um resultado negativo. Para servir como controlo do procedimento, uma linha colorida aparece sempre na região de controlo (C), indicando que o volume da amostra foi suficiente e que ocorreu a absorção da membrana. (64)

Neste laboratório efetuei a pesquisa de antigénio *Chlamydia* em amostras de urina masculina provenientes do centro de infertilidade. Esta é uma das análises de rotina realizadas em indivíduos do sexo masculino que pretendem doar esperma.

3.6. Fezes

As infeções do aparelho gastrointestinal têm uma alta incidência na população em geral, com maior morbilidade em alguns grupos etários, particularmente nas crianças e idosos. Bactérias (ex. *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli O157*, *Vibrio colerae*, *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*) vírus (ex. *rotavirus*), leveduras (ex. C*andida spp.*), protozoários (ex. *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*) e outros parasitas chegam ao trato gastrointestinal por via oral (alimentos, água e mãos contaminadas), podendo levar a infeções neste trato. Nos países desenvolvidos, as *Salmonellas*, as *Shigellas* e o

Campylobacter são os principais agentes causadores de gastroenterites. A E. coli O157 está geralmente associada a colite hemorrágica. [58]

3.6.1. Exame bacteriológico e micológico de fezes

Para o exame bacteriológico e micológico o recipiente deve ser esterilizado e as fezes devem ser entregues diariamente no laboratório.

A escolha dos meios de cultura tem em consideração os microrganismos que mais vulgarmente estão associados a infeções do trato gastrointestinal, sendo as *Salmonellas* e as *Shigellas* os patogénicos mais prováveis e, portanto, aqueles que se pesquisam em amostras de fezes. Ambas pertencem ao género *Enterobacteriaceae* e não são fermentadoras da lactose. Ao contrário das *Shigellas*, as *Salmonellas* são produtoras de H_2S. Tanto a *Salmonella* spp. como a *Shigella* spp. são sempre consideradas agentes patogénicos.

O exame bacteriológico e micológico de fezes é realizado de acordo com a figura 17.

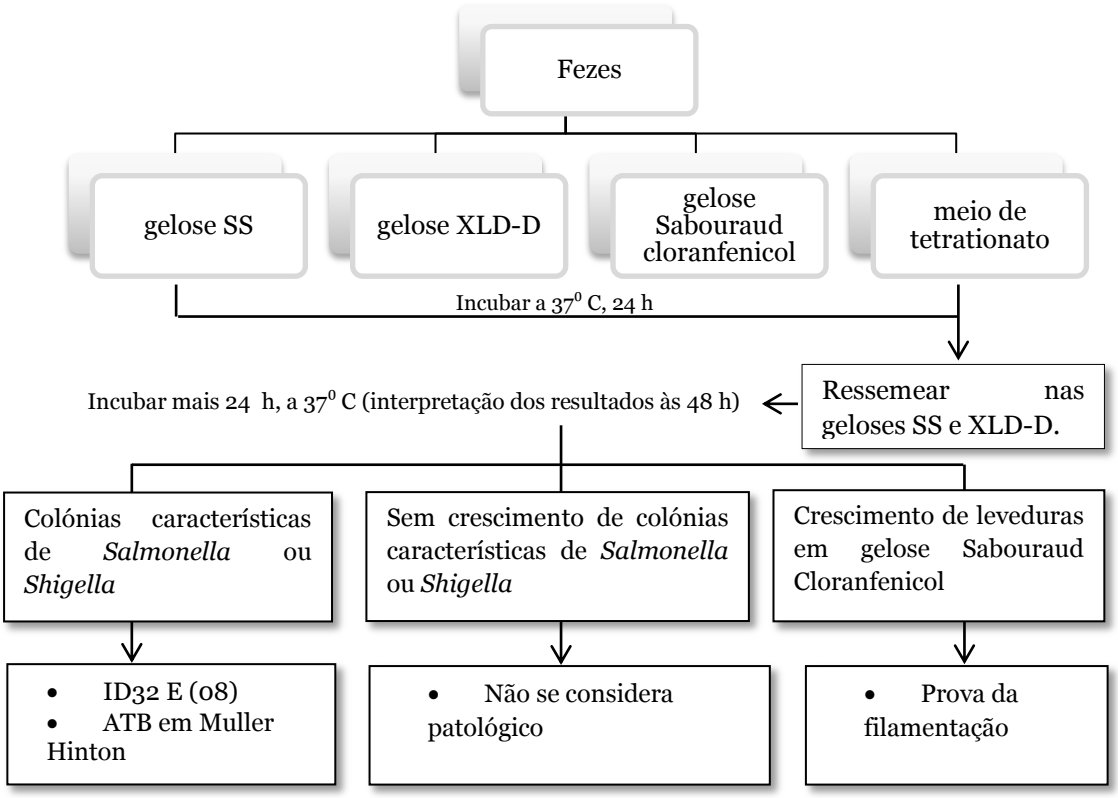

Fezes
gelose SS
gelose XLD-D
gelose Sabouraud cloranfenicol
meio de tetrationato
Incubar a 37⁰ C, 24 h
Ressemear nas geloses SS e XLD-D.
Incubar mais 24 h, a 37⁰ C (interpretação dos resultados às 48 h)
Colónias características de *Salmonella* ou *Shigella*
Sem crescimento de colónias características de *Salmonella* ou *Shigella*
Crescimento de leveduras em gelose Sabouraud Cloranfenicol
ID32 E (08)
ATB em Muller Hinton
Não se considera patológico
Prova da filamentação

Figura 17 - Representação esquemática do processamento de amostras de fezes para exame microbiológico.

3.6.2. Exame parasitológico de fezes

Para o exame parasitológico a amostra de fezes é colhida para um recipiente preferencialmente com boca larga, de modo a facilitar o exame macroscópico. Os parasitas que mais comummente causam infeções no trato gastrointestinal são os nematodes

Ascaris lumbricoides e *Enterobius vermicularis* e o protozoário *Giardia lamblia*. Outros parasitas menos prevalentes são as *Taenias*.

O exame parasitológico de fezes inclui:

- Exame macroscópio

Tem extrema importância, devendo-se ter em atenção a consistência das fezes, a presença de sangue, muco e de elementos parasitários.

A presença de sangue e muco normalmente indica invasão da mucosa intestinal por parte do parasita. Esta presença aponta para determinados parasitas (ex. *Entamoeba hystolítica*). Fezes líquidas têm elevada probabilidade de conter formas vegetativas de protozoários enquanto a probabilidade de existirem quistos diminuir com o aumento da fluidez das fezes. As formas vegetativas são sensíveis à refrigeração, pelo que as fezes líquidas não devem ser colocadas no frigorífico. Podem ser visualizados macroscopicamente nas fezes fêmeas de *Enterobius vermicularis*, proglotes de *Taenia* e vermes de *Ascaris lumbricoides*.

- Exame microscópio

É preparada uma suspensão de fezes em soro fisiológico, para posterior visualização microscópica. A análise microscópica passa pela pesquisa de formas vegetativas, ovos ou quistos produzidos pelos diferentes parasitas.

3.7. Outros produtos

3.7.1. Exsudado vagino-retal para a pesquisa de *Streptococcus agalacteae*

Os exsudados vagino-retais para pesquisa de *Streptococcus* β-hemolítico do grupo B ou *Steptococcus agalacteae* são frequentemente solicitados em mulheres grávidas. Este microrganismo é um membro da flora normal em cerca de 40% das mulheres adultas. Durante o parto normal pode ocorrer transmissão vertical da bactéria da mãe para o recém-nascido e ao invadir a corrente sanguínea dos neonatos esta bactéria pode causar sépsis e meningite. [58] Para evitar estas complicações é realizado o rastreio de *S. agalacteae* em exsudados vagino-retais de mulheres grávidas e, no caso de a bactéria estar presente pode ser considerado o tratamento antimicrobiano ou o parto por cesariana.

O *S. agalacteae* é um cocos de Gram (+) que apresenta uma β-hemólise em gelose de sangue (hemólise completa com halo claro ao redor das colónias). [58] A pesquisa de *S. agalacteae* em exsudados vagino-retais é efetuada de acordo com a figura 18.

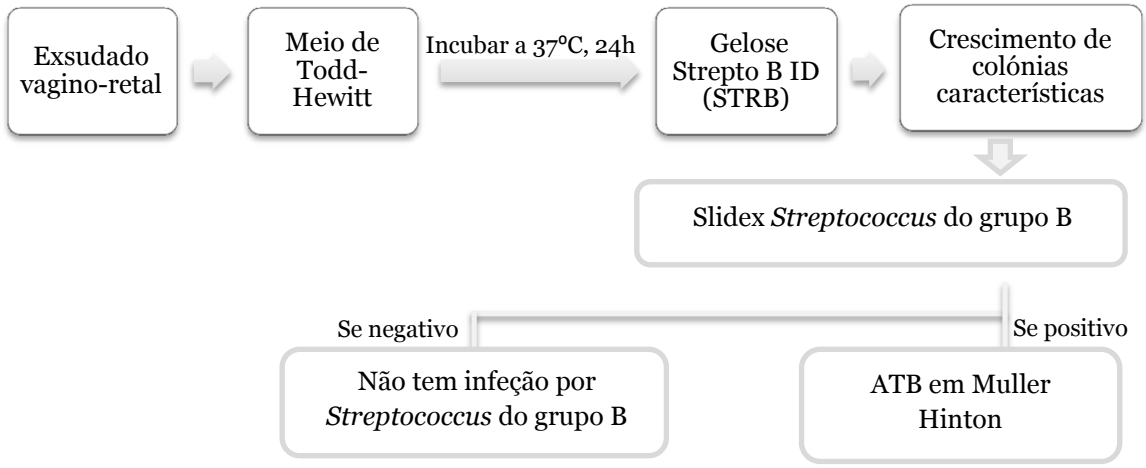


Figura 18 – Representação esquemática do processamento de amostras de exsudados vagino-retais, para pesquisa de *S. agalactiae*, em mulheres grávidas.

- **Slidex ® Strepto Plus**

Princípio

- Teste rápido de aglutinação de micropartículas de látex para identificar os *Streptococcus* dos grupos A, B, C, D, F e G, segundo a classificação de Lancefield.

Os *Streptococcus* β hemolíticos possuem frequentemente antigénios específicos de grupo, que podem ser extraídos e identificados com antissoros.

Os reagentes são constituídos por partículas de látex sensibilizadas com anticorpos dirigidos contra os antigénios de cada grupo. A presença de antigénios correspondentes provoca uma aglutinação visível.

O diferente grupo das estirpes de *Streptococcus* permitirá uma orientação adequada do tratamento antibiótico. (65)

Procedimento

Após cultura, as colónias isoladas de *Streptococcus* são colhidas e colocadas num tubo que contém o reagente de extração. O antigénio específico do grupo que se encontra na parede da bactéria é então extraído enzimaticamente. O antigénio extraído é identificado por partículas de látex sensibilizadas por um anticorpo antiantigénio do grupo dos *Streptococcus* presentes (há um reagente de látex para cada grupo de *Streptococcus).*

Se o antigénio estiver presente, o reagente de látex correspondente é aglutinado. Se o antigénio estiver ausente o reagente de látex permanece em suspensão homogénea. (65)

3.7.2. Exsudado vaginal

As amostras de exsudado vaginal permitem a pesquisa de microrganismos causadores de infeções no trato genital feminino. Algumas destas infeções são devidas a

microrganismos endógenos cuja patogenecidade é ativada por fatores do hospedeiro ou por desequilíbrio da flora saprófita. [58]

A flora vaginal normal é constituída essencialmente por *Lactobacillus*, *Corynebacterium spp*., *Staphylococcus* coagulase negativo, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, leveduras e anaeróbios. Os microrganismos mais frequentemente associados a infeção vaginal são o *Streptococcus agalacteae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Micoplasma hominis*, *Listeria monocytogenes, Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* e também *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus saprophyticcus*, entre outros. [58] Esta amostra é processada de acordo com a figura 19.

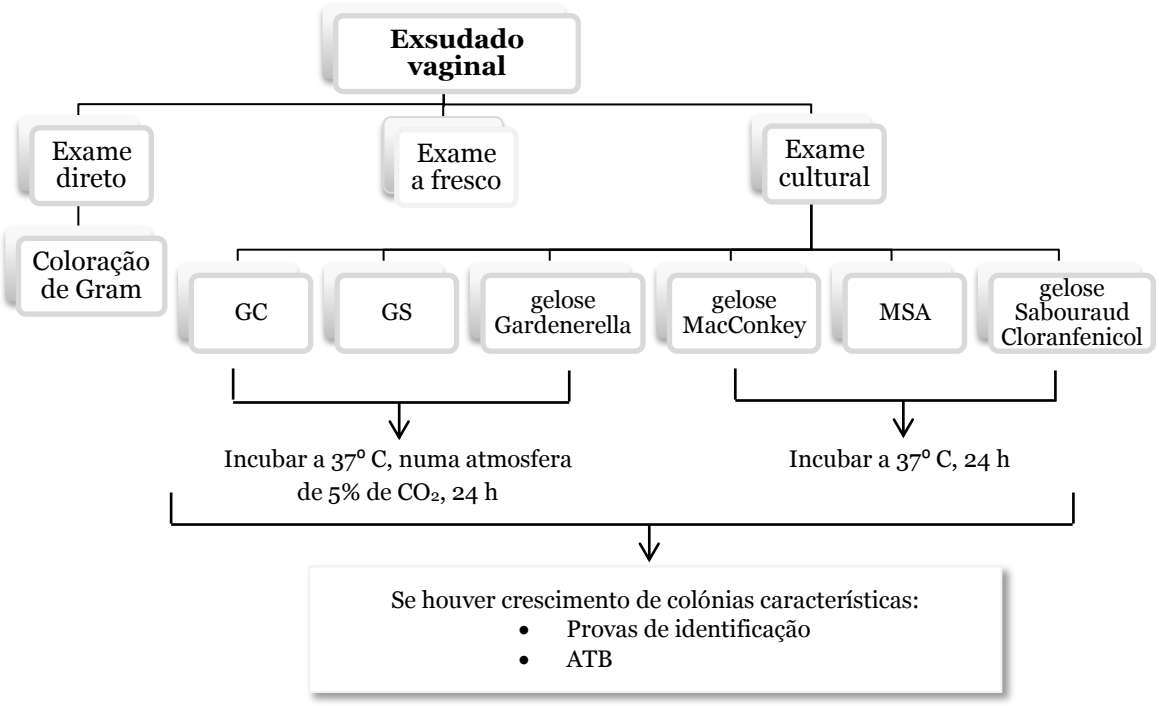


Figura 19 – Representação esquemática do processamento de exsudados vaginais, para análise microbiológica.

A coloração de Gram é realizada com o intuito de averiguar a presença de espécies de *Neisseria* e *Gardnerella*, para além de verificar se estão presentes bacilos ou cocos de Gram (+) ou (-).

Os membros pertencentes ao género *Neisseriaceae* são, diplococos de Gram (-) e oxidase positivas. [58] Dentro destas existem dois patogénicos muito importantes para o Homem: *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae* (tabela 4), sendo que a última deve ser sempre pesquisada em exsudados vaginais.

Tabela 4 - Características da *Neisseria gonorrhoeae* e microscopia observada. [37, 58]

Características da *Neisseria gonorrhoeae*
• É sempre considerada patogénica, é transmissível por via sexual ou perinatal e requer tratamento. • No homem causa uretrite como manifestação predominante, e pode estar associada a complicações como epididimite, prostatite e estenose uretral. • Na mulher pode originar corrimento vaginal, endocervicites, uretrites e doença inflamatória pélvica. • Em récem-nascidos pode causar uma conjuntivite denominada Oftalmia *neonatorum*.
Microscopia
• O método mais utilizado para a visualização dos gonococos é a coloração de Gram, a partir de exsudados vaginais e uretrais. Caracteristicamente apresentam-se como diplococos de Gram (-), sendo obrigatório estarem dentro das polimorfonucleares, serem em forma de feijão ou bagos de café e terem os lados achatados ou côncavos adjacentes. • A microscopia permite fazer o diagnóstico.

A *Gardnerella vaginalis* é outra bactéria procurada em exsudados vaginais através da coloração de Gram. (Tabela 5) Para o possível isolamento desta bactéria também se pode utilizar a gelose *Gardnerella*, referenciada anteriormente.

Tabela 5 - Características da *Gardenerlla vaginalis,* aspeto microscópico e isolamento em meio de cultura. [58]

Características da *Gardnerella vaginalis*
• São pequenos bacilos ou coco-bacilos irregulares, que se coram irregularmente pelo cristal de violeta. • Faz parte da microbiota vaginal de cerca de 70% das mulheres em idade reprodutiva, mas está associada a vaginose bacteriana, quando predomina na flora vaginal em substituição dos *Lactobacillus* de *Doderlein*. A vaginose bacteriana e a presença de *Gardnerella* estão associadas também ao parto prematuro, rutura prematura de membranas e corioamnionite. Pode causar sépsis em recém-nascidos e raramente infeção urinária em adultos.
Microscopia e Isolamento
• São visualizadas e caracterizadas através da coloração de Gram pela presença das "clue cells", que são células epiteliais abarrotadas de pequenos bacilos Gram lábeis. É pleomórfica, Gram variável [ora Gram (-) ora parcialmente e fracamente Gram (+)], imóvel e sem cápsula. É um anaeróbio facultativo, fermentador lento, catalase e oxidase negativas. • O isolamento é feito em gelose *Gardnerella*, onde estas bactérias crescem e produzem uma β-hemólise.

As vaginites também podem ser provocadas por *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e outras leveduras do género *Candida*. O exame a fresco é essencial para a pesquisa de *Trichomonas vaginalis,* causadora de tricomonose. (Tabela 6)

Tabela 6 - Características da *Trichomonas vaginalis,* deteção microscópica do parasita e manifestações clínicas frequentemente observadas na mulher e no homem. (66)

Características da *Trichomonas vaginalis*
• Parasita móvel (apresenta flagelos e membrana ondulante), cuja mobilidade é apenas evidenciada no exame a fresco. • É uma parasitose do homem e da mulher.
Microscopia
• Deteção microscópica de trofozoitos em exsudados vaginais e uretrais, mantidos a 37^0C de modo a preservar a mobilidade dos trofozoitos. • Permite fazer o diagnóstico laboratorial.
Manifestações clínicas na mulher
• A mulher é frequentemente sintomática, ao contrário do homem que é maioritariamente assintomático. • A tricomonose na mulher apresenta uma grande variedade de situações desde a apresentação assintomática até à infeção severa (vaginite). • Vaginites causadas por *Trichomonas vaginalis* associam-se frequentemente a leucorreia abundante.
Manifestações clínicas no homem
• A tricomonose no homem pode ser classificada em três grupos: estado assintomático; estado agudo caracterizado por uretrite purulenta abundante; doença assintomática leve, clinicamente indistinguível de outras causas de uretrite. • A infeção normalmente ocorre por contacto sexual com mulher infetada. • No estado sintomático há corrimento escasso, disúria, prurido, ulceração peniana, e sensação de queimadura após relação sexual. • As complicações são raras, mas podem incluir epididimites, prostatites e infertilidade.

3.7.3. Exsudado uretral

As uretrites são infeções na uretra com sintomatologia mais evidenciada no homem comparativamente com a mulher.

A flora normal da uretra masculina contém *Staphylococcus* coagulase negativos, *Corynebacterium spp*., *Micrococcus*. Os agentes patogénicos frequentemente associados a infeções a este nível são a *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Enterobacteriaceae*, *Mycoplasma* spp., *Ureaplasma* spp., *Herpes simplex* (vírus), fungos, entre outros. (58)

A *Neisseria gonorrhoeae* é procurada na coloração de Gram e a *Trichomonas vaginalis* no exame a fresco, tal como realizado no estudo microbiológico do exsudado vaginal, referido *à priori.*

O estudo microbiológico desta amostra é realizado conforme indicado na figura 20.

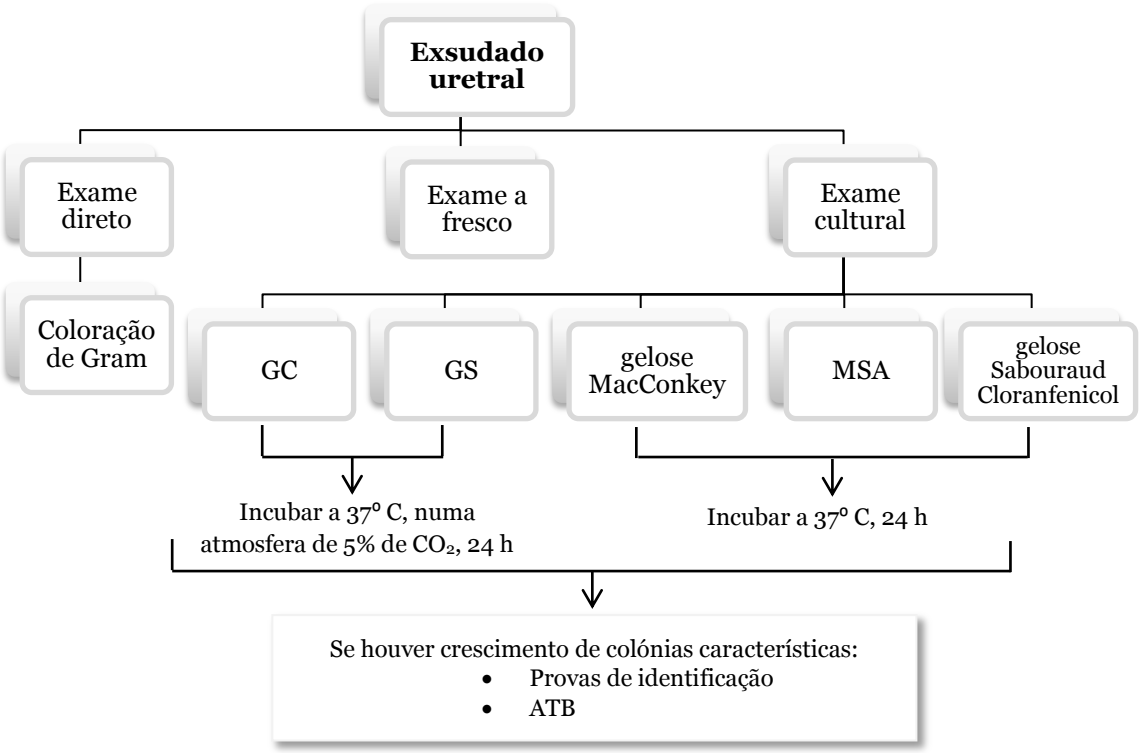


Figura 20 – Representação esquemática do processamento de exsudados uretrais, para análise microbiológica.

3.7.4. Exsudado purulento

A flora normal da pele é constituída essencialmente por *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterim* spp. e *Propionibacterium*, e em menos proporção por *S. aureus*, *Micrococcus* e algumas *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Proteus* spp. e *Acinetobacter*). Bactérias como o *Staphylococcos aureus*, incluindo MRSA (*S. aureus* resistentes à meticilina), *Streptococcus* do grupo A (*S. pyogenes*) e *Pseudomonas aeruginosa*, são importantes patogénicas da pele. [58]

O processamento desta amostra é feito de acordo com a figura 21.

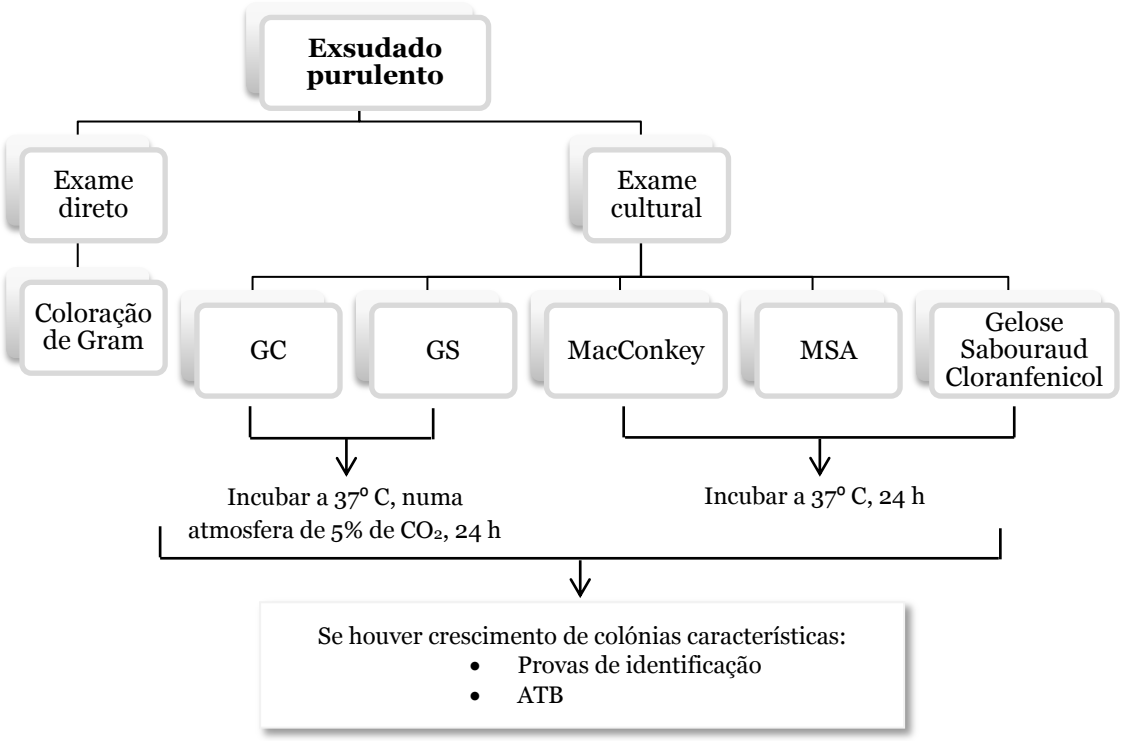


Figura 21 – Representação esquemática do processamento de exsudados purulentos, para análise microbiológica.

3.7.5. Exsudado auricular

Otite externa

Otite externa é o termo usado para definir uma inflamação da pele do canal auditivo (porção visível do ouvido até à membrana timpânica) tendo geralmente como agentes etiológicos bactérias e fungos. [67] Estas infeções podem resultar da remoção de cera pela exposição excessiva à água (atividades aquáticas, humidade e transpiração) ou por meios mecânicos (inserção de cotonetes, dedos e aparelhos auditivos). Ao contrário do ouvido médio, o canal externo não é estéril possuindo uma flora normal constituída por *Staphylococcos*, *Corynebacterium* e em menor proporção propionibactérias. Relativamente aos agentes patogénicos a *Pseudomonas aeruginosa* é o agente bacteriano predominante, seguida do *S. aureus*. Outras bactérias como o *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* e *H. influenzae* podem também ser agentes causadores destas infeções. Os fungos pertencentes aos géneros *Aspergilos* spp. e *Candida* spp. são os mais representativos neste tipo de infeções. [68, 69]

O processamento de exsudados auriculares para exame microbiológico é efetuado do mesmo modo que o processamento de exsudados purulentos, indicado na figura 21.

3.7.6. Expetoração

As infeções do trato respiratório inferior e superior são distintas na fisiopatologia bem como nos microrganismos responsáveis pela infeção.

Trato respiratório superior

O trato respiratório superior (laringe, nariz, nasofaringe, orofaringe, seios perinasais e ouvido médio) apresenta uma flora normal constituída por *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Moraxella catarrhalis* e espécies não patogénicas de *Neisseria* e *Haemophilus*. Algumas destas bactérias, tal como a *Moraxella catarrhalis*, podem tornar-se oportunistas levando a infeções. Os principais agentes potencialmente patogénicos são a *Neisseria meningitidis*, o *Streptococcus pneumoniae* e o *Haemophilus influenzae*. Um dos principais agentes causadores de amigdalites é o *Streprococcus pyogenes*. (58)

Trato respiratório inferior

Ao contrário do trato respiratório superior, o trato respiratório inferior em condições normais não apresenta bactérias. As infeções do trato respiratório inferior (ex. traqueíte, bronquite aguda e crónica e pneumonia) podem ser causadas por diversos microrganismos, como o *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, bacilos de Gram (-) como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Legionella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros. (58)

A amostra mais frequentemente colhida para diagnóstico de infeção do trato respiratório inferior é a expetoração (deve ser a primeira da manhã, colhida após higiene oral, proveniente de tosse profunda e deve ser acondicionada em recipiente estéril). Deve-se evitar o excesso de saliva.

O diagnóstico das infeções respiratórias inferiores é frequentemente dificultado pela contaminação das amostras com flora comensal da orofaringe, durante a colheita. O laboratório deve processar apenas as amostras de boa qualidade. Para avaliar a qualidade da amostra, tendo em conta a presença de células epiteliais pavimentosas da orofaringe e leucócitos, deve-se efetuar a coloração de Gram e observar ao microscópio ótico, com a objetiva de 10 x (cerca de 10 campos). As amostras são classificadas segundo o critério de Murray e Washington ou equivalente, e segundo este critério, processam-se as amostras que pertencem aos grupos 4 (células epiteliais - 10-25 e leucócitos - 25) e 5 (células epiteliais <10 e leucócitos - 25). Este critério não deve ser empregue em doentes neutropénicos e na pesquisa de agentes como o *Mycobacterium* spp., *Legionella* spp., *Mycoplasma* spp. (não fazem parte da flora normal da orofaringe e não a colonizam). (60)

A análise de expetoração (exame direto e cultural) foi realizada conforme a figura 22.

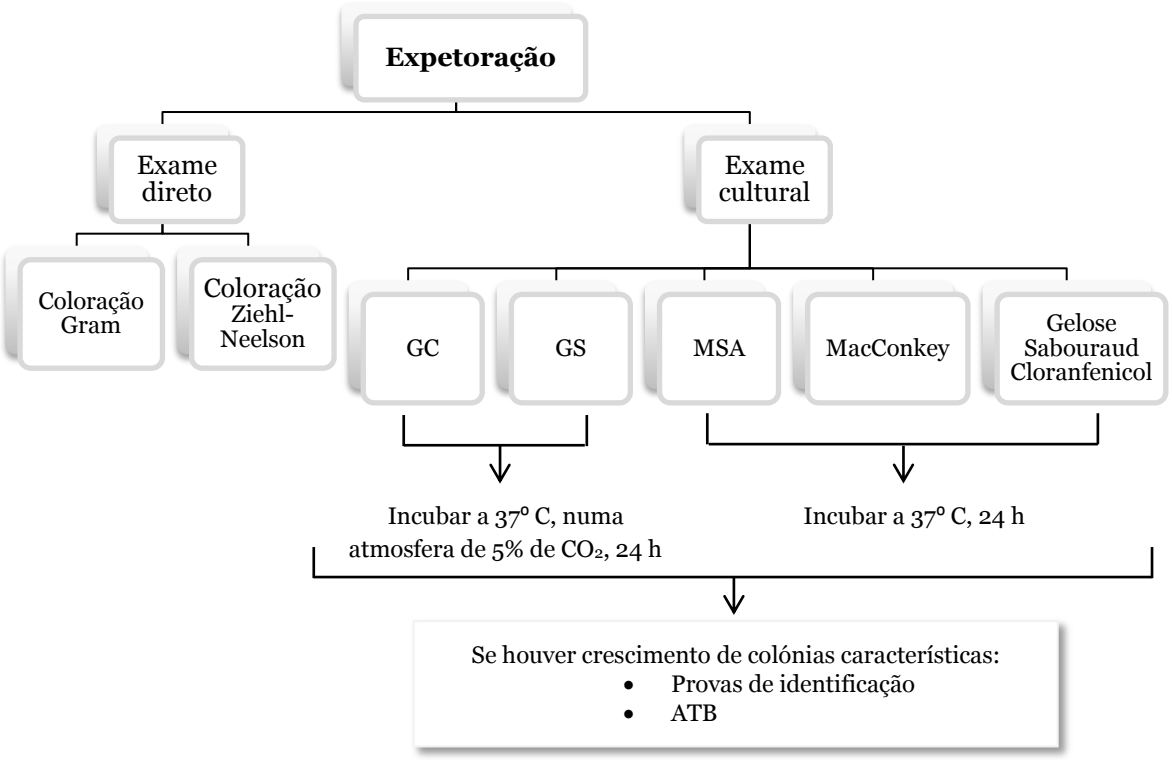


Figura 22 – Representação esquemática do processamento da expetoração para exame direto e cultural.

No caso de haver crescimento de colónias características de *Haemophilus influenzae* faz-se a identificação da espécie através da prova para demonstração da exigência dos fatores de crescimento X (hemina) e/ou V (NAD), em meio de Muller Hinton.

3.7.6.1. Expetoração para pesquisa direta e cultural de Bacilo de Koch

A família das *Mycobacteriaceae* compreende apenas o género *Mycobacterium*, no qual se inclui a espécie *Mycobacterium tuberculosis* ou bacilo de Koch. (Tabela 7)

Tabela 7 - Características microscópicas e culturais do *Mycobacterium tuberculosis*.

Características microscópicas do *M. tuberculosis*
• Observam-se bacilos de 3 a 4 µm de comprimento que aparecem frequentemente dispostos em cadeias paralelas. (70)
Características culturais do *M. tuberculosis*
• O *M. tuberculosis*, tal como as restantes micobactérias, apresenta exigências nutritivas, crescendo apenas em meios apropriados (meio de Lowenstein-Jensen). Desenvolve-se lentamente (incubação de cerca de três a quatro semanas) à temperatura de 35^0 C a 37^0 C, de modo a ocorrer a formação de colónias típicas, com aspeto rugoso e sem pigmentação (colónias em "couve flor"). (58)

A tuberculose é uma doença infeciosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que pode afetar qualquer órgão, aparelho ou sistema do organismo humano, sendo as formas mais frequentes a pulmonar, ganglionar, renal, intestinal, osteo-articular e meníngea.
A principal via de entrada do *M. tuberculosis* no Homem é a via respiratória, pela inalação de gotículas contendo o agente infecioso (transmissão inter-humano). Porém a tuberculose apresenta um baixo risco de doença ativa uma vez que as partículas inaladas são fagocitadas por macrófagos originando aquela que se chama de tuberculose latente (o sistema imune consegue controlar a multiplicação dos bacilos, no interior dos macrófagos). Na maior parte dos casos ocorre tuberculose latente, podendo esta evoluir para tuberculose doença. (58)

O processamento da expetoração para pesquisa direta e cultural de *M. tuberculosis* foi realizado de acordo com a figura 23.

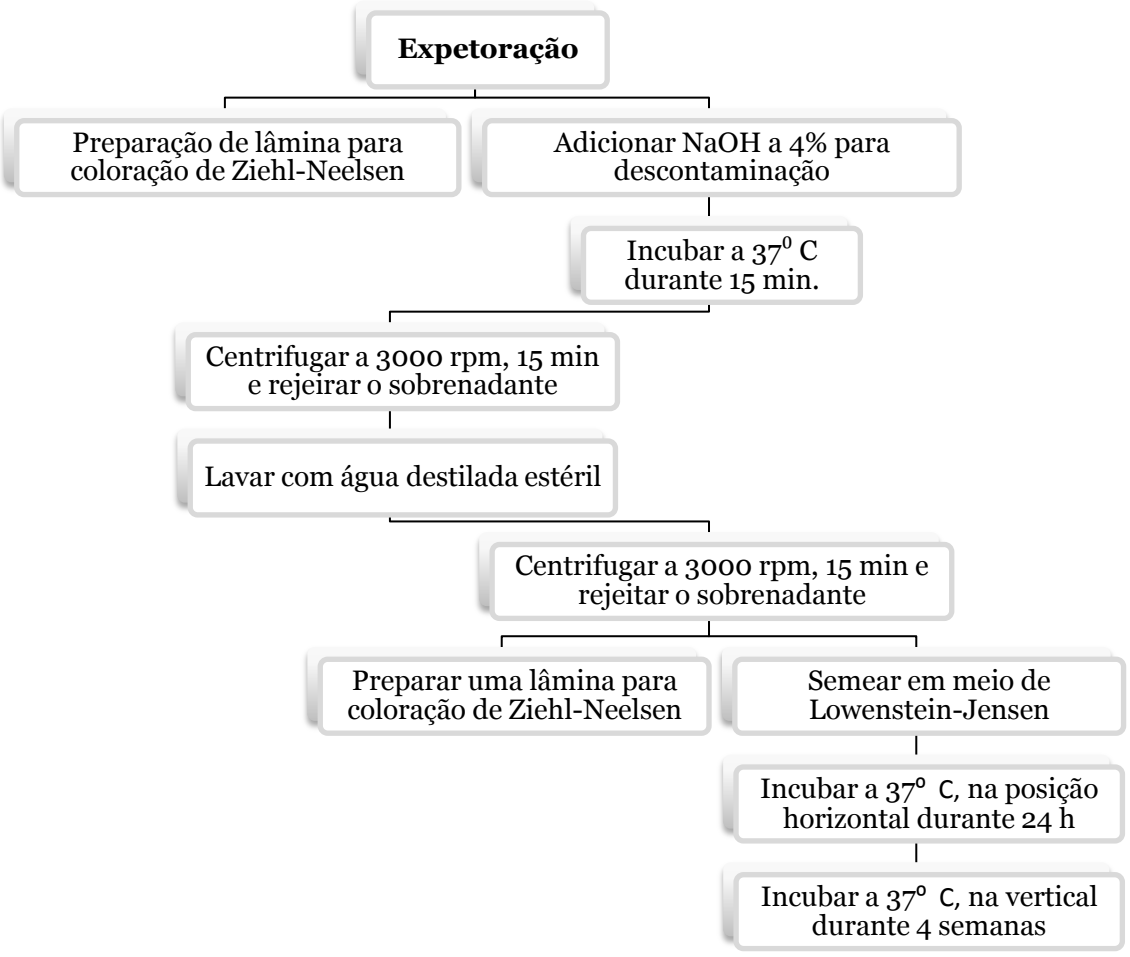

Expetoração
Preparação de lâmina para coloração de Ziehl-Neelsen
Adicionar NaOH a 4% para descontaminação
Incubar a 37⁰ C durante 15 min.
Centrifugar a 3000 rpm, 15 min e rejeirar o sobrenadante
Lavar com água destilada estéril
Centrifugar a 3000 rpm, 15 min e rejeitar o sobrenadante
Preparar uma lâmina para coloração de Ziehl-Neelsen
Semear em meio de Lowenstein-Jensen
Incubar a 37° C, na posição horizontal durante 24 h
Incubar a 37° C, na vertical durante 4 semanas

Figura 23 - Representação esquemática do processamento da expetoração para pesquisa direta e cultural de *Mycobacterium tuberculosis*.

4 – HEMATOLOGIA

O estudo hematológico tem elevada importância clínica e geralmente inclui a determinação do hemograma, o estudo dos reticulócitos, a determinação da velocidade de sedimentação (VS) e o estudo do processo de coagulação, determinações que serão referidas neste capítulo.

4.1. Hemograma

O hemograma é uma das análises mais solicitadas na avaliação laboratorial que permite despistar a presença de eventual doença, uma vez que existe uma grande variedade de patologias que induzem alterações nesta análise.

A determinação do hemograma é realizada a partir de amostras de sangue total (EDTA) e deve ser efetuada no dia em que é feita a colheita.

O hemograma inclui determinações qualitativas e quantitativas das células sanguíneas.

Hemograma	
Estudo quantitativo	Estudo qualitativo
Nº eritrócitos (N x 10^{12} GV/L) Hematócrito (L/L) Concentração da hemoglobina (g/dL) Índices hematimétricos (VGM (fL); HGM (pg); CHGM (g/dL); HDW; RDW; PDW; PLT; MPV; P-LCR) Nº leucócitos (N x 10^9 GB/L) Fórmula leucocitária (% e valor absoluto (N x 10^9 /L)) Contagem das plaquetas (N x 10^9Pl/L)	Avaliação da morfologia dos eritrócitos - Cor - Tamanho - Forma - Inclusões eritrocitárias Avaliação da morfologia dos leucócitos Avaliação da morfologia das plaquetas (despiste de pseudotrombocitopenia)

No caso da contagem das plaquetas ser reduzida deve pedir-se nova colheita de sangue, usando citrato como anticoagulante, porque o EDTA pode promover a agregação plaquetária. Assim sendo, o número de plaquetas pode estar diminuído devido ao efeito do anticoagulante EDTA e não como consequência de alguma patologia. A colheita de sangue com citrato (não causa agregação plaquetária) permite diferenciar estas situações.

Neste laboratório a determinação do hemograma é realizada pelo autoanalisador de hematologia Coulter HMX, da Beckman. (Figura 24)

Figura 24 – Autoanalisador de hematologia Coulter HMX, da Beckman.

Princípio do ensaio

Este aparelho tem por base o princípio da impedância e a citometria de fluxo.

A contagem de células por impedância, descrita primeiramente por Wallace Coulter em 1956, depende do facto dos eritrócitos serem maus condutores de eletricidade, enquanto os diluentes utilizados na determinação são bons condutores; esta diferença é a base deste sistema de contagem. Este instrumento permite contar os leucócitos e subdividi-los em neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos através de dois canais: a contagem de leucócitos totais e de basófilos são feitas por impedância após lise diferencial (os basófilos são mais resistentes à perda do citoplasma em meio ácido). Os outros elementos são identificados no segundo canal, com uma combinação da medida de impedância, citoquímica e absorvância (negro-clorazol). Este corante liga-se fortemente aos grânulos dos eosinófilos, de modo intermédio aos grânulos dos neutrófilos, fracamente aos grânulos dos monócitos e os linfócitos não são corados. [71]

4.2. Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços sanguíneos são visualizados microscopicamente sempre que existem alterações significativas em qualquer uma das células sanguíneas pelo método automático, de modo a verificar microscopicamente a presença dessas anormalidades. A coloração dos esfregaços sanguíneos é conseguida pelo kit Hemacolor.

4.3. Velocidade de sedimentação

A VS é definida como a velocidade com que os eritrócitos sedimentam num determinado período de tempo. Este é um teste comum na hematologia, muito sensível, porém não específico. A VS aumenta num grande número de doenças inflamatórias e neoplásicas, bem como na gravidez. Estes processos podem ser acompanhados por modificações na forma, número e dimensões dos eritrócitos e também alterações na composição plasmática que conduzem a variações na VS.

➲ **Eritrócitos**

- Os drepanócitos, esferócitos, entre outros eritrócitos com forma modificada conduzem a uma redução da VS, uma vez que dificilmente se formam os empelhamentos eritrocitários ("rouleaux");
- Uma diminuição da concentração de eritrócitos contribui para um aumento da VS, enquanto um aumento da concentração (policitemia) provoca uma diminuição;
- Alterações no volume dos eritrócitos têm reflexo no valor da VS. Uma macrocitose leva a uma diminuição da VS (sedimentam mais rapidamente), ao contrário de uma microcitose que provoca um aumento da VS.

➲ **Composição plasmática**

- Um aumento do fibrinogénio e de proteínas de fase aguda no plasma (haptoglobina, ceruloplasmina, CRP, α1-antitripsina, α2-macroglobulina) contribuem para um aumento da VS. A formação de "rouleaux" é também favorecida pelo aumento da concentração de imunoglobulinas. Pelo contrário, um aumento da concentração de albumina contribui para uma diminuição da VS.

Neste laboratório, este teste é efetuado a partir de amostras de sangue total (EDTA), pelo aparelho TEST 1 THL, da ALIFAX. (Figura 25)

Figura 25 – Autoanalisador TEST 1 THL, da ALIFAX, usado para a determinação da VS.

Princípio do ensaio

O instrumento TEST 1 THL, da ALIFAX é um microfotómetro capilar que tem como princípio de análise a fotometria capilar de fluxo (análise cinética). [72]

4.4. Contagem dos reticulócitos

Os reticulócitos são eritrócitos imaturos que apresentam dimensões maiores que os eritrócitos maduros, não possuem núcleo e contêm RNA e ribossomas no citoplasma, por isso, estas células ainda possuem a capacidade de sintetizar Hb. O número de reticulócitos é um excelente indicador da eritropoiese. [73] A contagem manual de reticulócitos é realizada utilizando um kit, que permite a coloração destas células através dos corantes azul de metileno e azul brilhante de cresilo que precipitam com o RNA e ribossomas, evidenciando estas estruturas, permitindo a distinção entre reticulócitos e eritrócitos maduros. [74]

Procedimento

Depois de misturar a amostra de sangue total (EDTA) com o corante do kit efetua-se um esfregaço para contagem microscópica dos reticulócitos.

Ao microscópio realiza-se a contagem dos reticulócitos existente num total de 1000 eritrócitos maduros.

Interpretação dos resultados

Valores alterados de reticulócitos podem ocorrer em diversas situações, estando algumas delas indicadas na figura 26.

Reticulocitose	Reticulocitopenia
•Gravidez e recém-nascidos (situação fisiológica) •Anemia hemolítica •Anemia pós-hemorrágica •Início do tratamento de anemias causadas por carência em nutrientes eritropoiéticos	•Aplasia medular •Anemia por carência em nutrientes eritropoiéticos (ferro, vitamina B12, ácido fólico)

Figura 26 – Representação de algumas situações onde pode ocorrer reticulocitose (à esquerda) e reticulocitopenia (à direita).

4.5. Grupos sanguíneos - Sistema ABO e Sistema Rhesus

Existem diversos grupos sanguíneos conhecidos que apresentam extrema importância dada a sua capacidade imunogénica, tendo, por isso, complicações a nível transfusional e de transplantação. Os grupos sanguíneos eritrocitários são constituídos por antigénios, geralmente glicolípidos e glicoproteínas, que se localizam na membrana do eritrócito e do eritroblasto. Podem existir no plasma anticorpos naturais e/ou anticorpos irregulares (imunes), dirigidos contra os antigénios eritrocitários. (75)

- **Anticorpos naturais** - Existem normalmente no soro de indivíduos que não apresentam o correspondente antigénio na membrana dos eritrócitos. São geralmente IgM, por isso não atravessam a barreira placentária. (75)
- **Anticorpos irregulares ou imunes** - Surgem em resposta à introdução de eritrócitos possuidores de antigénios ausentes da membrana dos eritrócitos do recetor (transfusão, passagem através da placenta durante a gravidez). São geralmente IgG, por isso, atravessam a barreira placentária. Também podem surgir após exposição bacteriológica por via alimentar. (75)

4.5.1. Sistema ABO

O sistema ABO envolve três genes alelos A, B e O cuja combinação entre eles origina os fenótipos AA, AO, BB, BO, AB e OO. Como os alelos A e B são codominantes entre si e dominam sobre o alelo O, os quatro principais fenótipos são A, B, AB e O. [76] (Tabela 8)

Este sistema caracteriza-se, pela presença de antigénios na membrana do eritrócito e eritroblasto e pela presença de anticorpos naturais no soro. A cada antigénio corresponde um anticorpo, que está ausente do soro de indivíduos que possuem o correspondente antigénio eritrocitário. [76]

Tabela 8 – Principais genótipos, fenótipos, antigénios e anticorpos naturais relativos ao sistema ABO. [75]

Genótipo	Fenótipo	Antigénio	Anticorpos naturais
AA ou AO	A	A	anti-B
BB ou BO	B	B	anti-A
AB (ou BA)	AB	A e B	Nenhum
OO	O	O	anti-A e anti-B

4.5.2. Sistema Rhesus

O sistema Rhesus é composto por dois genes RhD e RhCE que codificam para um mosaico de antigénios (DCEcde) na membrana dos eritrócitos e, ao contrário do sistema ABO, é caracterizado pela ausência de anticorpos naturais no soro. [76]

A determinação do fator Rh nos laboratórios de rotina é realizada apenas pela pesquisa do antigénio D utilizando o soro anti-D. O antigénio D pode estar presente ou ausente da membrana dos eritrócitos, resultando nos fenótipos RhD positivo e RhD negativo, respetivamente. [76]

O sistema imunitário de um indivíduo que não possui antigénio D, quando na presença desse antigénio, facilmente é estimulado produzindo anticorpos imunes. Estas situações podem ocorrer na gravidez ou em transfusões, podendo ocasionar a doença hemolítica do recém-nascido ou reações hemolíticas graves. Nos serviços de transfusão de sangue realiza-se o estudo completo (anti-C, anti-c, anti-e, anti-E e anti-D) do sistema Rhesus. [76]

Neste laboratório a determinação do sistema ABO é efetuada segundo a classificação direta (pesquisa de antigénios eritrocitários), pela técnica em tubo, tal como a determinação do sistema Rhesus, usando sangue total (EDTA) como amostra.

Procedimento – técnica em tubo

1. Preparar uma suspensão de eritrócitos em soro fisiológico;
2. Em três tubos identificados com A, B e D colocar uma gota de reagente anti-A, anti-B e anti-D, respetivamente;
3. A cada tubo adicionar uma gota da suspensão;
4. Centrifugar os tubos a 200 rpm, durante 1 min.

Interpretação dos resultados

Depois da centrifugação agitam-se suavemente os tubo e se:

- há ressuspensão - resultado negativo, não ocorreu aglutinação;
- não há ressuspensão - resultado positivo, ocorreu aglutinação.

Os possíveis fenótipos dos sistemas ABO e Rhesus, com a indicação dos tubos onde ocorre aglutinação estão referidos na tabela 9.

Tabela 9 – Possíveis fenótipos relativos ao sistema ABO e Rhesus.

Grupo A Rh+	• aglutinação no tubo A • aglutinação no tubo D
Grupo B Rh+	• aglutinação no tubo B • aglutinação no tubo D
Grupo AB Rh+	• aglutinação nos tubos A e B • aglutinação no tubo D
Grupo O Rh+	• não há aglutinação nos tubos A e B • aglutinação no tubo D
Grupo A Rh-	• aglutinação no tubo A • não há aglutinação no tubo D
Grupo B Rh-	• aglutinação no tubo B • não há aglutinação no tubo D
Grupo AB Rh-	• aglutinação nos tubos A e B • não há aglutinação no tubo D
Grupo O Rh-	• não há aglutinação nos tubos A e B • não há aglutinação no tubo D

Existem indivíduos que apresentam variantes do antigénio D: D-fraco (número reduzido de antigénios D) e D-parcial (falta de epítopos D ou epítopos alterados). [75] Estes indivíduos dão Rh negativo na prova para a determinação do sistema Rhesus anteriormente referida (não há aglutinação com o soro anti-D), mas, na realidade são Rh

positivo. Tendo em conta esta situação, sempre que se obtém um resultado Rh negativo na determinação do sistema Rhesus com o soro anti-D, tem de se verificar se este indivíduo possui uma variante do antigénio D e, por isso, é Rh positivo, ou se não apresenta nenhum tipo de antigénio D na superfície dos eritrócitos, sendo, deste modo Rh negativo. Esta verificação é extremamente importante para evitar complicações a nível transfusional.

Procedimento para a pesquisa de variantes D

1. Incubar a suspensão de eritrócitos com o soro anti-D (tubo D) durante 15 min a 37^0 C;
2. Proceder a três lavagens com soro fisiológico, centrifugando a 1500 rpm durante 5 min;
3. No final da terceira lavagem, adicionar uma gota de soro de Coombs e centrifugar durante 1 min a 200 rpm;
4. Observar microscopicamente a aglutinação.

Interpretação dos resultados

- Ausência de aglutinação dos eritrócitos – Ausência de variante D (Rh-)
- Aglutinação dos eritrócitos – Presença de variante D (Rh+)

4.6. Prova de Coombs

A prova de Coombs pode ser dividida em direta e indireta. (Tabela 10) Ambas utilizam soro de Coombs que é constituído por anticorpos antiglobulina humana. (75)

Tabela 10 – Definições de provas de Coombs direta e indireta e situações em que estas provas podem ser utilizadas.

Prova de Coombs indireta - pesquisa de anticorpos no soro
• Usada em: Provas de compatibilidade transfusional; Pesquisa de anticorpos irregulares (grávida); Pesquisa de fator D-fraco ou D-parcial.
Prova de Coombs direta - pesquisa de anticorpos ligados à membrana eritrocitária
• Usada em: Doença hemolítica do recém-nascido; Anemia hemolítica autoimune; Hemólise imune induzida por medicamentos; Reações hemolíticas transfusionais.

Durante este estágio apenas efetuei a prova de Coombs indireta, que passo a explicar mais pormenorizadamente no ponto 4.6.1.

4.6.1. Prova de Coombs indireta

Durante a minha permanência no setor de hematologia efetuei esta prova para pesquisa de anticorpos irregulares em mulheres grávidas Rh negativo e para pesquisa de variantes D.

A prova de Coombs indireta para pesquisa de anticorpos em grávidas apresenta um procedimento diferente daquele que é usado para a pesquisa de variantes D (referido anteriormente), uma vez que na primeira situação faz-se a pesquisa de anticorpos no soro e na segunda a pesquisa de antigénio D na membrana do eritrócito.

Quando se formam anticorpos anti-D (IgG) num indivíduo Rh negativo podem surgir reações hemolíticas pós-transfusionais, eritroblastose fetal ou doença hemolítica do recém-nascido. (75)

A pesquisa de anticorpos irregulares na mulher grávida Rh negativa é efetuada com o intuito de evitar a ocorrência de doença hemolítica do recém-nascido. Esta doença resulta da passagem de anticorpos IgG da circulação materna, através da placenta, para a circulação fetal, onde vão reagir com os eritrócitos fetais promovendo a sua destruição pelo sistema reticuloendotelial fetal. (75)

Quando uma mulher Rh negativa está grávida de um feto Rh positivo os eritrócitos fetais ao entrarem na circulação materna, desencadeiam um processo de sensibilização levando à produção de anticorpos anti-D. Numa próxima gravidez, os anticorpos anti-D atravessam a placenta e se o feto for Rh positivo ligam-se à membrana dos eritrócitos fetais levando à destruição dos mesmos. (75)

Procedimento para a pesquisa de anticorpos irregulares no soro

1. Incubar os eritrócitos do grupo O Rh^+ com o soro a testar durante uma hora a 37^0 C;
2. Executar três lavagens em soro fisiológico, centrifugando a 1500 rpm durante 5 min;
3. Depois da terceira lavagem adicionar uma gota de soro de Coombs ao sedimento e centrifugar a 200 rpm, durante 1 min;
4. Observar ao microscópio se ocorreu aglutinação dos eritrócitos.

Interpretação dos resultados

Se ocorrer aglutinação dos eritrócitos significa que o soro apresenta anticorpos anti-D.

4.7. Coagulação

- Tubos para a colheita de plasma

Os tubos para obtenção de plasma contêm citrato de sódio como anticoagulante, o qual promove a remoção do cálcio, impedindo o processo de coagulação.

Depois de centrifugar os tubos a 4500 rpm, durante 15 min obtém-se o plasma (no sobrenadante) que é utilizado para as provas de coagulação.

Os plasmas têm de ser mantidos num ambiente refrigerado até ao momento da análise.

Resumo

A hemostasia é um processo fisiológico que tem como objetivo manter o sangue no estado fluido e confinado ao sistema vascular, sem que haja hemorragia ou trombose.

O estudo do processo hemostático é feito obrigatoriamente em indivíduos com hemorragias espontâneas, em estudo pré-operatório, indivíduos com história familiar sugestiva, indivíduos com doenças que estão associadas a distúrbios hemostáticos (ex. insuficiência hepática), eventos trombóticos, entre outras situações.

Quando se pretende efetuar o estudo da coagulação para se localizar uma deficiência no processo de coagulação utiliza-se o mecanismo de coagulação *in vitro*, que apesar de não ser igual ao processo de coagulação *in vivo*, é bastante útil em termos didáticos e para efeitos de interpretação das determinações laboratoriais. (77)

O mecanismo de coagulação *in vitro* inclui três vias, indicadas na figura 27.

Via intrínseca	•Inclui os fatores XII, XI, IX e VIII
Via extrínseca	•Inclui o fator VII
Via comum	•Inclui os fatores V, X, I e II

Figura 27 – Vias intrínseca, extrínseca e comum do mecanismo de coagulação *in vitro* e fatores de coagulação incluídos em cada uma delas.

Existem diversos testes laboratoriais para localizar o distúrbio no processo de coagulação, tais como o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), o tempo de protrombina (TP), o tempo de trombina (TT) e o tempo de hemorragia (TH).

Neste laboratório os testes que efetuei no âmbito do processo de coagulação foram o TTPa e o TP. O TT é uma das análises enviadas para laboratório externo.

Estas determinações são executadas pelo aparelho Option 4 Plus, da bioMérieux. (Figura 28)

Figura 28 – Aparelho Option 4 Plus, utilizado para a determinação do TTPa e TP.

Este aparelho possui uma região com um termóstato, dividida em 3 zonas: zona de incubação das amostras (I), zona de medição (M) e zona de incubação dos reagentes (R).

Princípio do funcionamento:

➲ **Deteção ótica do coágulo com agitação magnética constante do meio reacional.**

A formação do coágulo é revelada através de um fotodíodo que, emitindo uma luz intermitente, elimina a interferência com a luz exterior. A rotação de uma esfera assegura a homogeneização do meio reacional e a ausência de sedimentação no caso de usar reagentes específicos.

➲ **Início automático da medição através da adição de reagente**

A modificação da densidade ótica causada pela adição de reagente desencadeia o início das medições. Aliás, esta é precedida por um ajuste automático da luz incidente que torna assim a medição independente das características óticas do meio reacional (reagente + plasma).

➲ **Paragem da medição por alteração da densidade ótica do meio reacional (aumento ou diminuição)**

Em função da concentração em fibrinogénio do meio, a reação traduz-se pelo aumento da densidade ótica (concentração forte em fibrinogénio) ou por uma diminuição da densidade ótica, no caso contrário. Neste último caso o papel da esfera para além da sua ação de homogeneização, é o de revelar ao seu redor a fibrina formada, o que torna a solução mais clara. Este sistema permite, portanto, detetar os coágulos mais finos (hipofibrinogenemias). (78)

As determinações que efetuei para o estudo do processo de coagulação serão abordadas de seguida.

4.7.1. Tempo de tromboplastina parcial ativada

Destina-se ao estudo da via intrínseca e comum do processo de coagulação, permitindo detetar deficiências nos fatores V, VIII, X, IX, XI, XII, fibrinogénio e protrombina, pré-calicreína e cininogénio de alto peso molecular. A adição de um reagente que contém Kaolino e fosfolípidos e cloreto de cálcio ao plasma citratado promove a ativação do processo de coagulação pela via intrínseca. (77)

O resultado é expresso em segundos. (79)

O aumento do TTPa pode ocorrer em patologias hepáticas, coagulação intravascular disseminada, deficiências em fatores de coagulação, excetuando o fator VII, terapêutica com heparina e com anticoagulantes orais e défice de vitamina K. (79)

4.7.2. Tempo de protrombina e INR

Mede o tempo de coagulação do plasma na presença de tromboplastina e de iões cálcio que desencadeiam o processo de coagulação pela via extrínseca. Permite então, o estudo da via extrínseca e da via comum. (77)

O resultado é expresso em segundos. (80)

Neste laboratório, para obter o valor normal do dia (plasma controlo), é efetuado um "pool" de plasmas normais citratados. Este valor é utilizado para calcular o INR (*international normalized ratio*), que é amplamente utilizado em indivíduos hipocoagulados, de forma a padronizar os resultados do TP.

$$INR = (TP_{doente}/TP_{controlo})^{ISI}$$ (índice de sensibilidade internacional da tromboplastina)

Para o cálculo do INR cada fabricante do reagente tromboplastina fornece o ISI.

A utilização do INR apresenta as vantagens de permitir comparações fiáveis entre determinações feitas em diferentes laboratórios, melhorar o controlo dos hipocoagulados e facilitar a uniformização internacional dos intervalos terapêuticos.

O TP pode aumentar em consequência de patologias hepáticas, hipoavitaminose K (carência de consumo, desordens na absorção ou no metabolismo da vitamina K, administração de antivitamina K), deficiências congénitas ou adquiridas de fatores II, VII, X, V e/ou fibrinogénio, fibrinólise, coagulação intravascular disseminada, entre outras situações. (80)

Conclusão

O estágio profissional, referido neste documento foi de relevância extrema para aprofundar os meus conhecimentos no âmbito das análises clínicas. A passagem pelas valências de bioquímica, serologia, microbiologia e hematologia permitiu-me adquirir capacidade para enfrentar a realidade laboratorial em termos teóricos, mas acima de tudo em termos práticos. Dado que ainda não tinha tido oportunidade de desenvolver um estágio num laboratório de análises clínicas, considero que este estágio foi fundamental para a minha integração no contexto da rotina laboratorial.

Bibliografia

1. Gaw A, Cowan RA, O`Reilly DSJ, Stewart MJ, Shepherd J. Bioquímica Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA; 2001.

2. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Glicose. Olympus Diagnostics; 2006.

3. Diabetes *Mellitus*. Disponível em www.spd.pt [acedido em 16/02/12]

4. Norma da Direção Geral de Saúde (DGS) referente ao Diagnóstico e Classificação de Diabetes *Mellitus*. 2011.

5. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Colesterol. Olympus Diagnostics; 2006.

6. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Triglicerídeos. Olympus Diagnostics; 2006.

7. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Creatinina. Olympus Diagnostics; 2007.

8. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Ureia. Olympus Diagnostics; 2006.

9. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Ácido úrico. Olympus Diagnostics; 2006.

10. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Bilirrubina total. Olympus Diagnostics; 2006.

11. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Bilirrubina direta. Olympus Diagnostics; 2006.

12. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Aspartato aminotransferase (AST). Olympus Diagnostics; 2006.

13. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Alanina aminotransferase (ALT). Olympus Diagnostics; 2006.

14. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Fosfatase alcalina (ALP). Olympus Diagnostics; 2006.

15. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Proteínas totais. Olympus Diagnostics; 2006.

16. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Albumina. Olympus Diagnostics; 2006.

17. Ciapini A, INTERLAB AB SCIENTIFIC TEAM. Protein electrophoresis and immunofixation: from the laboratory to the clinical practice. Manual da INTERLAB.

18. Bula do equipamento Microgel, referente à eletroforese de proteínas séricas INTERLAB.

19. Silva ROP, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Rev Med Minas Gerais 2008; 18 (2): 116-22.

20. O'Connell T, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. Am Fam Physician 2005 Jan; 71 (1): 105-12.

21. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Hemoglobina glicada. Olympus Diagnostics; 2004.

22. Guia de utilização de reagentes - Química Clínica, Microalbuminúria. Olympus Diagnostics; 2006.

23. Bula referente ao VISITECT® PREGNANCY. Omega Diagnostics Ltd; 2010.

24. Manual do operador do URYSIS® 2400, versão 2.0. Roche Diagnostics; 2001.

25. Bula do equipamento URISYS® 2400 referente à determinação da urina tipo II. Roche Diagnostics; 2010.

26. Bula do teste para a deteção de sangue oculto nas fezes NADAL® FOB. nal von minden; 2010.

27. Egglestone SI, Turner AJL. Serological diagnosis of syphilis. Commun Dis Public Health 2000 Sep; 3 (3): 158-62.

28. Bula do IMMUTREP® RPR. Omega Diagnostics Ltd; 2008.

29. Bula do IMMUTREP® TPHA. Omega Diagnostics Ltd; 2004.

30. Bula do AVITEX® CRP. Omega Diagnostics Ltd; 2005.

31. Bula do AVITEX® RF. Omega Diagnostics Ltd; 2003.

32. Bula do AVITEX® ROSE WAALER. Omega Diagnostics Ltd; 2003.

33. Bula do AVITEX® IM. Omega Diagnostics Ltd; 2003.

34. Awinsky MLJ, Ohara PM, Elkhoury MR, Faria NC, Cavalcante KRLJ. Estado da arte da brucelose em humanos. Rev Pan-Amaz Saude 2010 Apr; 1 (4): 75-84.

35. Bula do MICROPATH® ANTIGENS/FEBRILE ANTIGEN. Omega Diagnostics Ltd; 2003.

36. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Filho JLL. *Salmonella* spp., importante agente patogénico veiculado em alimentos. Cien Saude Colet 2008 Sep-Oct; 13 (5): 1675-83.

37. Ferreira WFC, Sousa JCF. Microbiologia. Lisboa: Lidel; 2000.

38. Gelose CLED. bioMerieux® SA; 2006.

39. Gelose Chapman (MSA-D). bioMérieux® SA; 2002.

40. Gelose D-COCCOSEL (DCO). bioMérieux® SA; 2002.

41. Gelose SS. bioMérieux® SA; 2009.

42. Gelose XLD-L. bioMérieux® SA; 2002.

43. Gelose Sabouraud cloranfenicol 2. bioMérieux® SA; 2005.

44. Gelose Columbia + 5% de sangue de carneiro. bioMérieux® SA; 2002.

45. Gelose de Chocolate PolyVitex. bioMérieux® SA; 2008.
46. Gelose MacConkey. bioMérieux® SA; 2009.
47. Gelose Strepto B ID (STRB). bioMériueux® SA; 2006.
48. Meio de Todd Hewitt + antibióticos. bioMérieux® SA; 2008.
49. Meio de Lowenstein- Jensen (LJ-T). bioMérieux® SA; 2010.
50. Gelose Muller Hinton. bioMérieux® SA; 2002.
51. Gelose Gardenerella (GAR). bioMérieux® SA; 2004.
52. ID32 E (08). bioMérieux® SA; 2006.
53. ID32 STAPH (08). bioMérieux® SA; 2006.
54. ATB™ UR EU (08). bioMérieux® SA; 2010.
55. ATB™ PSE EU (08). bioMerieux® SA; 2010.
56. ATB™ STAPH EU (08). bioMérieux® SA; 2010.
57. Manual do instrumento mini API. bioMérieux® SA.
58. Struthers KJ, Westren RP. Clinical Bacteriology. London: Manson Publishing Ltd; 2003.
59. Bula do reagente oxidase. bioMérieux® SA; 2005.
60. Fonseca AB, Sebastião C, Martins FJC, Ribeiro MGVC, Calheiros I, Lito LM, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde, Dr. Ricardo Jorge, Observatório Nacional da Saúde (ONSA); 2004. p. 1-193.
61. Correia C, Costa E, Peres A, Alves M, Pombo G, Estevinho L. Etiologia Das Infeções Do Trato Urinário e sua Suscetibilidade aos Antimicrobianos. Act Med Port 2007 May; 20: 543-9.
62. Roriz-Filho JS, Vilar FC, Mota LM, Leal CL, Pisi PCB. Infeção do trato urinário. Medicina 2010; 43 (2): 118-25.
63. Lopes HV, Tavares W. Diagnóstico Das Infeções do Trato Urinário. Rev Assoc Med Bras 2005 Nov-Dec; 51 (6): 116-22.
64. Bula do dispositivo para teste rápido de clamídia (cotonete/ urina) SureScreen Diagnostics Ltd; 2007.
65. Slidex® Strepto Plus. bioMérieux® SA; 2008.
66. Maciel GP, Tasca T, Carli GA. Aspetos clínicos, patogénese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. J Bras Patol Med Lab 2004 Jun; 40 (3): 152-60.
67. Enoz M, Sevinc I, Lapeña JF. Organismos bacterianos e fúngicos em pacientes com otite externa sem fatores de risco para infeção fúngica em Erzurum, Turquia. Braz J Otorhinolaryngol 2009 Sep-Oct; 75 (5): 721-5.
68. Osguthorpe JD, Nielsen DR. Otitis externa: review and clinical update. Am Fam Physician 2006 Nov; 74 (9): 1510-6.

69. Sander R. Otitis externa: a practical guide to treatment and prevention. Am Fam Physician 2001 Mar; 63 (5): 927-36.

70. Coelho AGV, Zamarioli LA, Reis CMPV, Duca BFL. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo Mycobacterium tuberculosis. J Bras Pneumol 2007 Nov-Dec; 33 (6): 707-11.

71. Bacall NS. Analisador automático hematológico e a importância de validar novos equipamentos em laboratórios clínicos. Rev Bras Hematol Hemoter 2009 Jul-Aug; 31 (4): 218-20.

72. Manual do operador TEST1® THL Microfotómetro capilar para a determinação da velocidade de sedimentação dos eritrócitos. ALIFAX S.P.A.; 2001.

73. João AR, Pinto S, Costa E. Subpopulações dos reticulócitos e fração de reticulócitos imaturos como indicadores de aumento da eritropoese em doentes com anemia por deficiência de ferro. Rev Bras Hematol Hemoter 2008; 30 (3): 188-92.

74. Bula do Kit EUROTUBO® coloração de reticulócitos e contagem. DELTALAB, S.L.

75. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH. Hematologia. 4ª ed. Porto Alegre: ARTMED; 2004.

76. Hoffbrand AV, Moss, P.A.H. Essencial Haematology. 6th ed.: WILEY-BLACKWELL; 2011.

77. Rezende SM. Distúrbios da hemostasia: doenças hemorrágicas. Rev Med Minas Gerais 2010 Aug; 20 (4): 534-53.

78. Manual de utilização do Option 4 Plus versão A. bioMérieux® SA; 2003.

79. C.K. PREST® para a determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.; 2011.

80. NEOPLASTINE® CI PLUS para determinação do tempo de protrombina. DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.; 2009.